



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

## **Evaluación del efecto antiinflamatorio en ratas albinas según el modelo edema plantar y efecto analgésico en ratones albinos según el modelo tail flick del extracto etanólico de Dalea isidori Barneby “Yerbechil”**

### **TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

### **AUTOR**

Margarita Gabriela CAMACHO SILVA

Camilo Dany HONORIO URBINA

### **ASESOR**

Francisco Javier María RAMÍREZ CRUZ

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

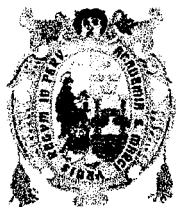
## Referencia bibliográfica

---

Camacho M, Honorio C. Evaluación del efecto antiinflamatorio en ratas albinas según el modelo edema plantar y efecto analgésico en ratones albinos según el modelo tail flick del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby “Yerbechil”. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2017.

---

721



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
 Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Decanato**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO EN RATAS ALBINAS SEGÚN EL MODELO EDEMA PLANTAR Y EFECTO ANALGÉSICO EN RATONES ALBINOS SEGÚN EL MODELO TAIL FLICK DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Dalea isidori* Barneby “YERBECHIL”**

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**MARGARITA GABRIELA CAMACHO SILVA Y CAMILO DANY HONORIO URBINA**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

**18 SOBRESALIENTE**

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 21 de junio de 2017.

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera  
 Presidente

Mg. Luis Alberto Rojas Rios  
 Miembro

Q.F. Maria Rosario Carreño Quispe  
 Miembro

Q.F. Walter Rivas Altez  
 Miembro

**“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”**





A mi querida madre, Fortunata, el pilar de mi vida, mujer de fortaleza, carácter y aptitud, quien ha apoyado incondicionalmente cada uno de mis pasos.

A mi padre, Cecilio, por todo su amor, guía y consejos.

A mis cinco hermanos mayores (Cecilia, César, Patricia, Consuelo y Carlos), por haberme brindado cuidados y protección desde que nací y por haber sido la influencia más grande a lo largo de mi formación. De todos ellos aprendí a no rendirme, a ser perseverante y a no conformarme, a soñar en grande, a ser amable con el prójimo y a contribuir con mi sociedad. Gracias a Dios y gracias a todos ellos soy lo que soy. Mil gracias.

A mis queridos sobrinos, que son la luz de mis ojos, quienes con una sonrisa me regalan la felicidad.

A mi cotesista, Camilo, por el arduo trabajo realizado todo este tiempo.

Bach. Margarita Camacho Silva

A mis padres, Humberto Honorio y Sabina Urbina, por el apoyo incondicional que me brindan día a día y por alentarme a ser una persona de bien.

A mis tres hermanos: Miriam, Jhonatan y Mily, por sus palabras de aliento.

A mis cinco sobrinos: Manuel, Martín, Thiago, Mathías y Alejandra.

A mi cotesista Margarita por acompañarme en este reto y por su arduo trabajo.

Bach. Camilo Dany Honorio Urbina

## **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento extensivo a nuestro asesor de tesis, el Mg. Francisco Javier Ramírez Cruz, quien desde un inicio nos otorgó su plena confianza para la realización del presente trabajo, brindándonos las facilidades, orientaciones y mostrando su buena disposición para trabajar en equipo.

Gracias por su buen criterio, su practicidad para hacer las cosas, por su corrección y aclaración de las dudas presentadas en el camino y por su motivación constante. Nuestra más sincera y afectuosa estima y admiración hacia su persona.

A los profesores de la cátedra de Toxicología, José Llahuilla y Alfonso Apesteguía. Muchas gracias por su desinteresado y amable apoyo.

Al profesor de la cátedra de Química Orgánica, César Fuertes Ruitón, por la colaboración y ayuda en el presente trabajo.

A las profesoras de la cátedra de Farmacognosia y al asistente Josimar, por facilitarnos el uso de las instalaciones del laboratorio.

A los profesores miembros del jurado, muchas gracias por su amable apoyo.

## ÍNDICE

Resumen

Abstract

I.	Introducción.....	1
	1.1 Objetivos.....	2
	1.1.1 Objetivo general.....	2
	1.1.2 Objetivos específicos.....	2
	1.1.3 Hipótesis.....	2
II.	Generalidades.....	3
	2.1 Antecedentes.....	3
	2.2 Marco teórico.....	8
	2.2.1 Descripción de <i>Dalea isidori</i> Barneby.....	8
	2.2.2 Inflamación.....	12
	2.2.3 Dolor.....	23
	2.2.4 Flavonoides.....	37
	2.2.5 Alcaloides.....	41
	2.2.6 Dosis letal media.....	48
III.	Parte experimental.....	49
	3.1 Materiales, equipos y reactivos.....	49
	3.2 Metodología.....	51
IV.	Resultados.....	69
V.	Discusión.....	90
VI.	Conclusiones.....	97
VII.	Recomendaciones.....	98
VIII.	Referencias bibliográficas.....	99
	Anexos	

## RESUMEN

El presente es un estudio experimental prospectivo, realizado en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde se determinó el efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby "Yerbechil". Para evaluar el efecto antiinflamatorio se empleó el método de edema plantar inducido por  $\lambda$  carragenina, utilizándose 36 ratas albinas (Holtzman) divididas en un grupo control, tres grupos para dosis diferentes del extracto (125 mg/Kg, 250 mg/Kg y 500 mg/Kg) y dos grupos para fármacos patrones (AAS 50 mg/Kg, naproxeno 50 mg/Kg); empleándose un pletismómetro digital PANLAB LE7500. El mayor efecto antiinflamatorio se evidenció a las dosis de 250mg/kg. El efecto analgésico se evaluó con el método de retirada de la cola (Tail-Flick), empleándose 36 ratones Balb/c, divididos en dos grupos para fármacos patrones (tramadol 20 mg/Kg y paracetamol 400 mg/Kg) y cuatro grupos para dosis diferentes del extracto (125 mg/Kg, 250 mg/Kg, 500 mg/Kg y 750 mg/Kg); cuantificándose el efecto analgésico con un medidor Tail-Flick PANLAB LE7106. El mayor efecto analgésico se evidenció a las dosis de 125 mg/Kg y 250 mg/Kg. Finalmente, según la guía 23 de la OECD, se determinó un DL50 oral mayor a 5000 mg/Kg para el extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.

**Palabras clave:** *Dalea isidori* Barneby, efecto antiinflamatorio, efecto analgésico, DL50.

## ABTRACT

Present is an experimental prospective study, made in Faculty of Farmacy and Biochemistry of San Marcos university, where was determined anti-inflammatory and analgesic effect of *Dalea isidori* Barneby "Yerbechil" ethanolic extract. For the assessment of anti-inflammatory effect was employed  $\lambda$  carragenina-induced plantar edema method, used thirty six albino rats (Holtzman), which were divided in six groups, control group, three groups for diferents doses of extract (125 mg/Kg, 250 mg/Kg, 500 mg/Kg) and two groups for pattern drugs (AAS 50 mg/Kg, naproxen 50 mg/Kg); used a PANLAB LE 7500 digital Plethysmometer. The greater anti-inflamtory effect was evidenced with a dose of 250 mg/Kg. The analgesic effect was employed withdrawal tail method (Tail-Flick), used thirty six albino mice (Balb/c) which were divided in six groups: two groups for pattern drugs (tramadol 20 mg/Kg, paracetamol 400 mg/Kg) and four groups for diferents doses of extract (125 mg/Kg, 250 mg/Kg, 500 mg/Kg and 750 mg/Kg) used a PANLAB LE 7106 Tail-Flick meter. The greater analgesic effect was evidenced with doses of 125 mg/ Kg and 250 mg/Kg. Finally, according to guide 23 of OECD, was determined an oral DL50 greater of 5000 mg/Kg for *Dalea isidori* Barneby ethanolic extract.

**Key words:** *Dalea isidori* Barneby, anti-inflammatory effect, analgesic effect,

LD 50.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>8PP:</b>	2',4'-dihidroxi-5'-(1'',1''-dimetilalil)-8-prenilpinocenbrin
<b>A<math>\alpha</math>:</b>	fibra alfa
<b>A<math>\delta</math>:</b>	fibra delta
<b>% In.TRD:</b>	porcentaje del incremento del tiempo de reacción al dolor
<b>ADP:</b>	adenosín difosfato
<b>AINEs:</b>	antiinflamatorios no esteroideos
<b>AMPc:</b>	adenosín monofosfato cíclico
<b>APME:</b>	asta posterior de la medula espinal
<b>ATC:</b>	sistema de clasificación anatómica, terapéutica, química
<b>ATP:</b>	adenosintrifosfato
<b>BRRV:</b>	bulbo raquídeo rostroventral
<b>CCC:</b>	célula central de Cajal
<b>CCF:</b>	cromatografía en capa fina
<b>CGRP:</b>	péptido relacionado con el gen de la calcitonina.
<b>COX 1:</b>	ciclooxigenasa 1
<b>COX 2:</b>	ciclooxigenasa 2
<b>DL50:</b>	dosis letal media
<b>DP1:</b>	prostanoides 1
<b>DP2:</b>	prostanoides 2
<b>EP2:</b>	prostaglandina EP2
<b>F1:</b>	fracción 1
<b>F2:</b>	fracción 2

<b>GABA:</b>	ácido gammaaminobutírico
<b>H<sub>0</sub>:</b>	hipótesis nula.
<b>H<sub>A</sub>:</b>	hipótesis alternativa.
<b>HA:</b>	hidroalcohólica
<b>HP:</b>	Hot Plate
<b>IASP:</b>	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
<b>ICAM:</b>	molécula de adhesión intercelular endotelial
<b>ICH:</b>	Comité Internacional para la Armonización
<b>IL:</b>	interleucina
<b>IP:</b>	receptor acoplado a la proteína G
<b>LCR:</b>	líquido cefalorraquídeo
<b>LT:</b>	leucotrieno
<b>M 1.1:</b>	muestra 1.1
<b>M 1.2:</b>	muestra 1.2
<b>mg/Kg:</b>	miligramos por kilogramo
<b>m.s<sup>-1</sup>:</b>	metros por segundo
<b>m s. n. m.:</b>	metros sobre el nivel del mar
<b>NA:</b>	noradrenalina
<b>NE:</b>	neuronas eferentes específicas
<b>NF-κB:</b>	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>NGF:</b>	factor de crecimiento nervioso



<b>NO:</b>	óxido nítrico
<b>NS:</b>	no significativo
<b>OECD:</b>	Organización Económica de Cooperación y Desarrollo
<b>OMS:</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PG:</b>	prostaglandinas
<b>PGF2:</b>	prostaglandina F2
<b>PGE2:</b>	dinoprostona o prostaglandina E2
<b>PGG2:</b>	prostaglandina G2
<b>PGH2:</b>	prostaglandina H2
<b>PGI2:</b>	prostaciclina
<b>Pm:</b>	peso molecular del alcaloide de mayor proporción en la muestra
<b>ppm:</b>	partes por millón
<b>RDA:</b>	neurona de rango dinámico amplio
<b>Rf:</b>	factor de retención
<b>s:</b>	segundos
<b>SG:</b>	sustancia gris
<b>SGP:</b>	sustancia gris periacueductal
<b>SINANPE:</b>	Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado
<b>SNC:</b>	sistema nervioso central
<b>SP:</b>	sustancia P
<b>St:</b>	estándar
<b>TENS:</b>	estímulo de nervio eléctrico transcutáneo
<b>TF:</b>	Tail-Flick

<b>TNF:</b>	factor de necrosis tumoral
<b>TxA<sub>2</sub>:</b>	tromboxano alfa-2.
<b>UPCH:</b>	Universidad Peruana Cayetano Heredia
<b>X:</b>	media
<b>XTRD:</b>	promedio del tiempo de reacción al dolor
<b>XTRD<sub>t</sub>:</b>	promedio del tiempo de reacción al dolor en un tiempo
<b>XTRD<sub>0</sub>:</b>	promedio del tiempo de reacción al dolor basal.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Inflorescencia de *Dalea isidori* Barneby.
- Figura 2.** Ubicación geográfica de la distribución de *Dalea isidori* Barneby.
- Figura 3.** Arbustos de *Dalea isidori* Barneby en el caserío La Colpa-Ichocán-Cajamarca.
- Figura 4.** Esquema comparativo de los puntos de unión de ciclooxigenasas COX-1 y COX-2.
- Figura 5.** Esquema de la sinapsis en la asta posterior de la médula espinal.
- Figura 6.** Ruta ascendente de la transmisión del dolor.
- Figura 7.** Representación de la Teoría del control de puerta del dolor.
- Figura 8.** Sistema descendente de control del dolor y lugar de acción de los opioides.
- Figura 9.** Organización del sistema analgésico endógeno que modula la transmisión nociceptiva en la asta posterior de la médula espinal y el sistema de células “on” y “off”.
- Figura 10.** Excitación e inhibición del sistema de células “on” y “off”.
- Figura 11.** Resumen de las dianas donde actúan los principales fármacos analgésicos.
- Figura 12.** Núcleo básico de los flavonoides.
- Figura 13.** Síntesis biogenética de los flavonoides.
- Figura 14.** Clasificación de alcaloides en base a su estructura química y origen biosintético.

- Figura 15.** Ejemplos de los principales alcaloides.
- Figura 16.** Esquema del tratamiento de la planta.
- Figura 17.** Esquema de la obtención del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby.
- Figura 18.** Esquema marcha fotoquímica.
- Figura 19.** Esquema de preparación de las concentraciones del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby para la determinación del efecto antiinflamatorio.
- Figura 20.** Esquema de la preparación de las concentraciones del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby para determinar el efecto analgésico.
- Figura 21.** Esquema del procedimiento para la determinación del DL50 oral.
- Figura 22.** Esquema de las principales etapas de desarrollo de trabajo.
- Figura 23.** Variación del volumen en el tiempo de las dosis del extracto y patrones.
- Figura 24.** Eficacia antiinflamatoria de las dosis de extracto y patrones.
- Figura 25.** Comparación de la eficacia del extracto de *Dalea isidori* Barneby respecto al naproxeno 50 mg/kg.
- Figura 26.** Comparación de la eficacia del extracto de *Dalea isidori* Barneby respecto al AAS 50 mg/Kg.
- Figura 27.** Comparación de las medias de los tiempos de reacción al dolor vs. Tiempo.

**Figura 28.** Representación en barras del porcentaje del incremento del tiempo de reacción al dolor (%In.TRD) a los 90 minutos en la prueba de efecto analgésico del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.

**Figura 29.** Comparación de la actividad analgésica del extracto de *Dalea isidori* Barneby respecto al tramadol 20 mg/Kg.

**Figura 30.** Comparación de la actividad analgésica del extracto de *Dalea isidori* Barneby respecto al paracetamol 400 mg/Kg.

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Escala analgésica según Organización Mundial de la Salud.
- Tabla 2.** Tratamiento del dolor.
- Tabla 3.** Potenciales efectos farmacológicos de diferentes flavonoides en humanos y animales.
- Tabla 4.** Solubilidad de los alcaloides.
- Tabla 5.** Principales alcaloides en el comercio.
- Tabla 6.** Concentraciones de las sustancias administradas a cada grupo de trabajo para la evaluación del efecto antiinflamatorio.
- Tabla 7.** Volúmenes administrados a cada grupo de trabajo para la evaluación del efecto analgésico.
- Tabla 8.** Concentraciones de las sustancias administradas a cada grupo de trabajo para la evaluación del efecto analgésico.
- Tabla 9.** Volúmenes administrados a cada grupo de trabajo para la evaluación del efecto analgésico.
- Tabla 10.** Prueba de solubilidad.
- Tabla 11.** Marcha fitoquímica.
- Tabla 12.** Análisis cromatográfico de flavonoides.
- Tabla 13.** Análisis cromatográfico de alcaloides.
- Tabla 14.** Cuantificación de alcaloides totales del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby.

- Tabla 15.** Valores promedio de la variación de volumen (mL) de los tratamientos en el tiempo.
- Tabla 16.** Eficacia antiinflamatoria para cada tratamiento en cada momento experimental.
- Tabla 17.** Promedios del tiempo de reacción al dolor (TRD) de los tratamientos en el tiempo.
- Tabla 18.** Análisis estadístico (ANOVA y test de Tukey) de los datos del porcentaje del incremento del tiempo de reacción al dolor (% $\ln$ .TRD) en la determinación del efecto analgésico del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.
- Tabla 19.** Resumen de los principales signos y comportamientos según el Test de Irwin del grupo A.
- Tabla 20.** Resumen de los principales signos y comportamientos del Test de Irwin que variaron segundo grupo B.
- Tabla 21.** Resultados del control de pesos inicial y final en la determinación de DL50 oral del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby y la ganancia de peso en porcentaje.
- Tabla 22.** Resumen del examen microscópico de los principales órganos de los ratones.

## I. INTRODUCCIÓN

La inflamación y el dolor son procesos fisiológicos comunes que deterioran la salud de las personas; están relacionadas a un sinnúmero de enfermedades que afectan a la población en general (niños, adultos y ancianos) y que son evidenciados en nuestra vida cotidiana al acudir a cualquier establecimiento de salud. Es por ello, que el propósito de la presente investigación es aportar mediante la corroboración de las propiedades analgésicas y antiinflamatorias descritas por la población, de *Dalea isidori* Barneby y así poder utilizar dicha planta como alternativa frente a los fármacos convencionales, para el tratamiento de las dolencias ya mencionadas.

Asimismo, es sabido que la mayoría de fármacos que se utilizan hoy en día para el tratamiento de la inflamación y el dolor, evidencian marcados efectos adversos a nivel de los diferentes sistemas del cuerpo, principalmente en el sistema digestivo y sistema nervioso central, es por ello, que la población de hoy muestra mayor interés hacia el uso de productos medicinales naturales.

Por tal motivo, es de suma importancia investigar y sugerir terapias alternativas, útiles para mitigar estos padecimientos mediante el uso de productos de origen natural, ya que cuentan con un gran potencial farmacológico y económico.

Sin lugar a dudas, el conocimiento tradicional que va de generación en generación no solo en nuestro país, sino de las poblaciones de todo el mundo, es el primer eslabón que aporta a la industria farmacéutica, información para encaminar proyectos de investigación donde se estudie a profundidad y con rigor científico alguna actividad terapéutica que posea algún recurso de origen natural promisor, en lo particular para el tratamiento del dolor y la inflamación.



## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo general:**

- Determinar el efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.

### **1.1.2. Objetivos específicos:**

- Realizar el análisis fisicoquímico del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.
- Determinar el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.
- Determinar el efecto analgésico del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.
- Determinar la toxicidad aguda estableciendo el DL50 oral.

### **1.1.3 Hipótesis:**

El extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby “Yerbechil” tiene efecto antiinflamatorio y analgésico.

## II.GENERALIDADES

### 2.1. Antecedentes

Referente a la planta objetivo de la investigación, *Dalea isidori* Barneby, no se han hallado investigaciones científicas previas a la misma, sin embargo, existe información científica de otras plantas que pertenecen al mismo género, y se describen a continuación.

Ruiz et al., indica que *Dalea strobilacea* Barneby (Hierba de Chile), es usada de forma tradicional en forma de cocción, haciendo hervir tallos con hojas e inflorescencias, para tratar resfríos e inflamación de los bronquios<sup>1</sup>.

Benites et al., evaluó la composición del aceite esencial de *Dalea strobilacea* Barneby. En este estudio, se obtuvieron los principales componentes por hidrodestilación de las partes aéreas siendo  $\beta$ -felandreno (44%) y el  $\alpha$ -pineno (18%), los metabolitos mayoritarios del aceite esencial. Se determinó la actividad antimicrobiana de dicho aceite contra *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*<sup>2</sup>.

El estudio realizado por Peralta et al 2011., aisló tres nuevas flavanonas preniladas obtenidas a partir extracto n-hexano de las raíces de *Dalea Boliviana*, las cuales fueron: (2S)-5,7,2'-trihidroxi-5'-(1'',1''-dimetilalil)-8-prenilflavanona [1]; (2S)-5,7,2'-trihidroxi-8,3'-diprenilflavanona [2]; (2S)-5,2'-dihidroxi-6'',6'-dimetilcromeno-(7,8:2'',3'')-3'-prenilflavanona [3], y el cromeno conocido dimetilpirano [4]. Además, evaluaron el efecto inhibidor de la enzima tirosinasa de los 4 componentes, según el procedimiento de Rahman, comparándolo con 2 flavanonas con actividad antitirosinasa demostrada (hesperetina y naringenina) y un control positivo ácido kojic. Las flavanonas 1,2,3 presentaron mejor actividad que el control positivo; mientras que el componente 4, hesperetina y

naringenina evidenciaron un efecto menor. Sin embargo, los compuestos aislados (1,2) demostraron una actividad superlativa respecto a los otros<sup>3</sup>.

En otro estudio, Peralta et al. 2013, se estableció que el género *Dalea* crece exclusivamente en el continente americano e incluye más de 250 especies. Su hábitat se extiende desde el oeste de Estados Unidos hasta la región central de Argentina y Chile. Las especies de *Dalea* autóctonas de Estados Unidos y México, han sido utilizadas tradicionalmente por diferentes comunidades indígenas como analgésicos, antimicrobianos, cicatrizantes, etc. Así mismo se ha demostrado que este género posee flavonoides prenilados, un subgrupo con estructuras de escasa distribución en la naturaleza. Sin embargo, según los avances realizados en los últimos años, permiten estimar interesantes aplicaciones terapéuticas como su actividad antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatoria y antioxidante<sup>4</sup>.

De acuerdo al estudio de Arango et al., el extracto en éter de petróleo de la parte aérea de *Dalea coerulea*, especie vegetal nativa de Colombia, se sometió a separaciones cromatográficas guiadas por bioensayo general de toxicidad general con *Artemia salina*. Una fracción denominada F2, constituida por mono y sesquiterpenos, mostró acción repelente e insecticida sobre *Xenopsylla sp.* y *Macrosiphum rosae*. De otra fracción denominada F7, se obtuvieron una mezcla compleja de carácter terpenoide y 4 flavanonas. Las flavanonas identificadas fueron: glabranin, 7-O-metilglabranin, 6-C-metilglabranin y 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona, las cuales no presentaron actividad tóxica significativa, pero la mezcla presentó alta acción tóxica contra larvas de *Spodoptera sunia* y acción larvicida contra *Galleria mellonella* y *Achroia grisella*<sup>5</sup>.

El estudio de Guffantte tuvo como objetivo demostrar la actividad citotóxica y antioxidante de los extractos de *Arcythophyllum thymifolium*, *Salvia squalens*, *Justicia chlorostachya*, *Myrcianthes rhopaloides*, *Dalea mustisii*. El efecto antioxidante se realizó según el método de inhibición de la polifelo oxidasa utilizando como patrón positivo la vitamina C y para la actividad citotóxica empleó a la *Artemia salina*. Concluyó que la especie con mayor actividad citotóxica y antioxidante fue la *Dalea mustisii*, ya que a una concentración de 10 µg fue 93,33% y a 10 ppm fue 11,11% de actividad antioxidante que aumenta a la par con la concentración. Asimismo, mediante el tamizaje fitoquímico *Dalea mustisii* evidenció presencia de flavonoides, azúcares reductores, taninos, alcaloides, resinas, triterpenos y grasas<sup>6</sup>.

Peralta et al. 2014, analizó las estructuras químicas presentes en *Dalea elegans*, a través de técnicas espectroscópicas, evidenciando dos flavonoides: 2',4'-dihidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrin (8PP) y 8 prenilpinocembrin; entre otras nuevas estructuras flavonoides aisladas de las partes aéreas de la planta. Todos estos componentes flavonoides fueron evaluados in vitro demostrando una actividad anti- tirosinasa<sup>7</sup>.

Además, se citan a continuación diversos trabajos científicos de investigación, los cuales han servido como referencia para establecer la metodología de trabajo para la evaluación de efecto antiinflamatorio y analgésico de *Dalea isidori* Barneby "Yerbechil".

Villena et al., evaluó el efecto antiinflamatorio de *Oenothera rosea* (Yawar socco) en ratas con inducción de inflamación aguda y crónica. Utilizó el modelo experimental edema subplantar inducido con carragenina. Concluyó que el

extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* en ratas presenta efecto antiinflamatorio<sup>8</sup>.

El estudio experimental de Churampi y Montes, tuvo como objetivo determinar la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) *L.H. Bailey* “tumbo serrano” utilizando el modelo experimental: edema auricular inducido por 12-O-tetradecanoil forbol-13 acetato y su uso como activo biológico en la industria cosmética. En conclusión, demostraron que el extracto etanólico de *Passiflora mollissima* (Kunth) *L.H. Bailey* “tumbo serrano” presentó actividad antiinflamatoria y seguridad como activo biológico en la industria cosmética<sup>9</sup>.

Hoyos y Yep desarrollaron un trabajo experimental, el cual tuvo dos etapas: la obtención, caracterización y evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de la especie *Baccharis latifolia* “Chilco”, y la obtención, caracterización y evaluación de la actividad antiinflamatoria de una forma farmacéutica de aplicación tópica conteniendo el extracto en estudio. Se evaluó el efecto antiinflamatorio utilizando el método del edema plantar inducido por carragenina. Finalmente, se determinó que el efecto antiinflamatorio del producto terminado es mayor al del extracto<sup>10</sup>.

Betancourt et al. evaluó el efecto analgésico del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Bixa Orellana* L., administrado vía oral. En él, se utilizó el método de Hot Plate y Contorsiones abdominales. Se concluyó que *Bixa Orellana* L. presenta actividad analgésica a nivel periférico<sup>11</sup>.

Por otro lado, el estudio experimental de Toro, evaluó la actividad analgésica aguda y crónica de *Phytolacca dioica*; donde trabajó con 3 extractos: extracto diclorometano, extracto metanólico y extracto butanólico. Para evaluar la

analgesia aguda empleó el ensayo de retirada de la cola “Tail-Flick” (TF), y el ensayo de placa caliente “Hot Plate” (HP), en ratones. Según los resultados obtenidos de los ensayos TF y HP, fue el extracto butanólico que evidenció mayor actividad analgésica<sup>12</sup>.

## 2.2. Marco teórico

### 2.2.1 Descripción de *Dalea isidori* Barneby

#### 2.2.1.1 Clasificación taxonómica

División: MAGNOLIOPHYTA

Clase: MAGNOLIOPSIDA

Subclase: ROSIDAE

Orden: FBALES

Familia: FABACEAE

Género: *Dalea*

Especie: *Dalea isidori* Barneby

La clasificación taxonómica fue realizada por el biólogo Severo Baldeón Malpartida. (**Anexo I**)



**Figura 1.** Inflorescencia de *Dalea isidori* Barneby.

### 2.2.1.2 Descripción morfológica

*Dalea isidori* Barneby es una planta leñosa erguida de 50 a 140 cm de alto, muy fragante y con morfología xerofítica. Subarbustos delgados decumbente o ascendente, tallos de baja verruculosa  $\pm$  2-3 diámetro de largo, con glabros excepto para las estipulas cilioladas, cálices blandos y sedosos, hojas punteadas verdosas o glaucescente, muchos de ellos llenos de braquiblastos laterales situados por debajo del tallo medio, con pico de flores subcompacto que se eleva muy por encima del follaje en la parte terminal del pedúnculo hasta los brotes largos hornotínicos. Tiene estipulaciones lanza-acuminadas, incluyendo el espolón asociado de hoja de 2-6 mm de largo, la lámina es glabrosa, dorsalmente marrón rojizo, volviéndose seca y espesa, de forma persistente. Los tallos de las hojas son de 2-24 mm de largo, los intervalos interfoliares son 1,5-4 mm de largo; foliolos (7) 9-13, con los distales casi palmados, las paletas son lineares-oblongoladas de 4-6 x 0.4-0.8 mm, micronulado agudo, ventralmente liso. Las glándulas fuscas, apenas protuberantes de la cara dorsal están dispersadas aleatoriamente. Posee pedúnculos de 2,5-4,5 cm de largo; con flores con espigas de 2-4.5 cm de largo; brácteas persistentes a través de la antesis, cada una doblada alrededor de un cáliz, el cuerpo es oblongo-oblongolado, posee un perfil de 3.5-4 x 1.5-2 mm, ampliamente pálido-marginado y de la base hacia arriba o sólo más allá del medio posee un color negruzco densamente glandular-verruculoso; en el ápice está abruptamente contraída en una cola liviana de 2-2.7 mm de largo<sup>13</sup>.

El cáliz es de 5.8-6.4 mm de largo, con tubo 10-acanalado  $\pm$  4-4.5 mm, sus membranas intercostales con diminutas glándulas-rociadas; pétalos bicolors, con rubescencia; los epistemonus de color lila o violeta-púrpura; de  $\pm$  8,5 mm de



largo, la hoja de  $\pm 4,7 \times 4,2$  mm, con glándula subapical muy pequeña; alas y quilla encaramada de 2-2.5mm por encima del hypanthium, la quilla de  $\pm 10$  mm de largo y sus láminas de  $6.5 \times 4$ mm, androceo de 8 mm de largo, ovario pilosulado distalmente, vaina no visible<sup>13</sup>.

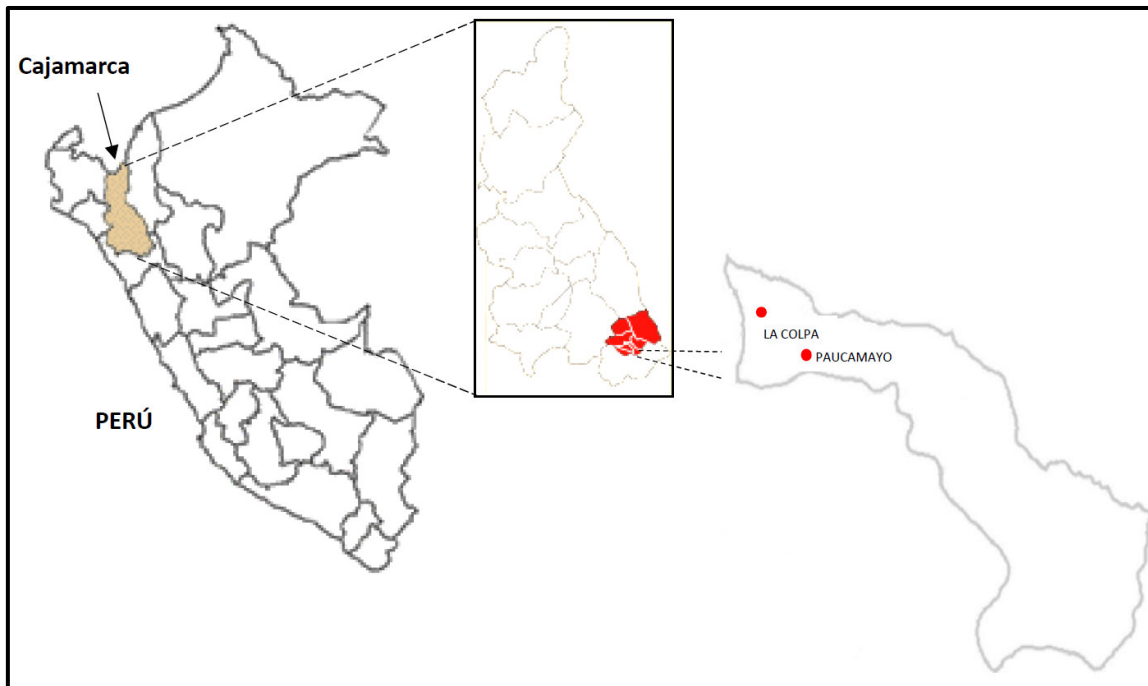
A nivel químico, Fabaceae se caracteriza por ser rica en compuestos flavonoides y alcaloides<sup>14</sup>. Es conocida vulgarmente como “Yerbechil”.

### **2.2.1.3 Ubicación geográfica**

Subarbusto, conocido de unas pocas localidades ubicadas en un valle interandino, en una subcuenca del Crisnejas<sup>15</sup>.

Planta endémica del sur de Cajamarca, confinada en áreas secas, con suelos calizos y vegetación de arbustos dispersos entre 2500-2800 m s.n.m.<sup>13</sup>

La especie *Dalea isidori Barneby* se ubica geográficamente entre los caseríos de La Colpa y Paucamayo, a 0.85 km y 1.5 km del pueblo de Ichocán, respectivamente; distrito de Ichocán (a 2596 m s.n.m.), provincia de San Marcos, departamento de Cajamarca<sup>16</sup>.



**Figura 2.** Ubicación geográfica de la distribución de *Dalea isidori* Barneby.

**Fuente:** Camacho/Honorio.



**Figura 3.** Arbustos de *Dalea isidori* Barneby en el caserío La Colpa-Ichocán-Cajamarca.

#### **2.2.1.4 Uso tradicional**

La especie *Dalea isidori Barneby* es usada tradicionalmente como antiinflamatorio de las vías respiratorias y analgésico digestivo.

Se hace hervir la inflorescencia incluyendo tallos y hojas, y se ingiere cuando el preparado está caliente. Se consume 2 veces al día, una toma en la tarde y otra en la noche.

### **2.1.2 Inflamación**

#### **2.1.2.1 Definición**

La inflamación es un proceso fisiológico, defensivo natural del organismo ante agresiones del medio, presentando signos como el dolor, calor, rubor y edema, además de pérdida de funcionalidad<sup>17</sup>.

#### **2.1.2.2 Mediadores de la inflamación**

La inflamación puede ser originada por factores endógenos (necrosis tisular o fractura ósea) o factores exógenos como lesiones por agentes mecánicos, físicos, químicos, biológicos (microorganismos) e inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad). Un proceso inflamatorio puede seguir distintas vías. La primera de ellas es la resolución del proceso con retorno a una estructura y función normales, en segundo lugar, puede ocurrir la supuración con formación de absceso, otra posibilidad es que se lleve a cabo la regeneración de tejido especializado o fibroso formando una cicatriz, y por último que el proceso se haga crónico por la persistencia del agente causante<sup>18</sup>.

La inflamación aguda dura alrededor de 48 a 72 horas después de las cuales los signos y síntomas comienzan a disminuir y comienzan los procesos de

reparación, si es posible. Si el cuadro se mantiene más allá de ese lapso de tiempo y el agente nocivo no es eliminado, la respuesta aguda evolucionará hacia la cronicidad.

En el desarrollo de la respuesta inflamatoria participan factores que son parte del organismo. Estos factores corresponden a moléculas contenidas en gránulos en forma de precursores o en estado inactivo, que existen tanto a nivel plasmático como a nivel celular. En estados en los que se provoca algún tipo de injuria sobre los tejidos, estas moléculas inactivas se colocan en contacto con otras moléculas, y así sufren activaciones y transformaciones y ejercen su acción sobre receptores celulares que se modifican estructural y funcionalmente para enviar señales intracelulares que a la vez modifican la estructura y/o función de las células implicadas en la respuesta inflamatoria. En la respuesta inflamatoria, primero se observa la modificación en el calibre de los vasos sanguíneos, luego ocurre una modificación en la permeabilidad vascular y por último se modifica la distribución de los leucocitos en los tejidos, desencadenando una serie de complejas reacciones destinadas a la eliminación de estos agentes. El primero de ellos es el factor XII de la coagulación que en su modalidad activa es capaz de accionar dos cascadas; la cascada de la coagulación y la cascada de las cininas<sup>18</sup>.

### ***1. Cascada de la coagulación***

La activación de la cascada de la coagulación tiene como fin que su producto final, la fibrina, obture la interrupción endotelial que pueda existir frente a la ruptura de los vasos sanguíneos, así devuelve la continuidad estructural y funcional de éstos, permitiendo la detención de la hemorragia. La trombina es un producto intermedio en la formación de fibrina que también posee propiedades

proinflamatorias aumentando la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular. Por otro lado, con la activación de la coagulación se activa el sistema fibrinolítico cuyo producto final, la plasmina, degrada la fibrina controlando su formación desmedida y da origen a los fibrinopéptidos que tienen como función aumentar la permeabilidad vascular<sup>18</sup>.

## ***2. Cascada de las cininas***

La cascada de las cininas tiene como fin la formación de la bradicinina, la que se forma a partir de un precursor plasmático, el cininógeno, reacción catalizada por un producto intermedio, la calicreína, la que por acción del factor XIIa se genera a partir de la precalicreína. La bradicinina tiene efecto sobre los vasos sanguíneos, produciendo un aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación arteriolar, contracción de la musculatura lisa y es un mediador del dolor, mientras que la calicreína ejerce una función quimiotáctica sobre los leucocitos.

Junto con estas dos cascadas, un daño tisular o celular puede estimular la liberación desde las células que los contienen, de otros mediadores químicos muy potentes, las llamadas aminas vasoactivas. La primera de ellas es la histamina, la cual es un compuesto almacenado en gránulos, principalmente en los mastocitos, basófilos y plaquetas, y es liberada frente a varios factores, entre ellos, las lesiones de tipo físico, reacciones inmunitarias, fragmentos del complemento, neuropéptidos como la sustancia P, citocinas y la proteína liberadora de histamina<sup>18</sup>.

Una vez liberada al medio extracelular ejerce su acción sobre receptores ubicados en células endoteliales, principalmente H1, produciendo un aumento de la permeabilidad vascular a nivel venular. Otro mediador químico importante

es la serotonina, éstos se liberan al medio extracelular cuando las plaquetas se agregan tras su contacto con ciertos compuestos como colágeno, trombina, ADP y complejos inmunes. También se libera por la acción del factor activador de plaquetas secretado por los mastocitos<sup>18</sup>.

### ***3. Sistema del complemento***

Existen noxas que en sí mismas no generan daño tisular en forma directa, pero son reconocidas como agentes extraños al organismo y que por esa condición puede inducir una respuesta inflamatoria. Este es el caso de virus, bacterias y hongos, y es otro el sistema preparado para mediar este reconocimiento, pero que complementa la acción de los anteriores descritos. Uno de sus productos finales es el complejo de ataque membrana constituido por los factores C5b, C6, C7, C8 y C9, el cual tiene la capacidad de formar poros o canales transmembranas sobre la superficie bacteriana produciendo un desequilibrio osmótico con la consecuente lisis de la bacteria. Otro producto, el C3b, contribuye indirectamente a la destrucción bacteriana a través de un fenómeno llamado opsonización. Otros productos tales como C5a y C3a, corresponden a moléculas que difunden en los tejidos. El sistema del complemento tiene dos formas de activarse, una a través del contacto de sus componentes C1 con complejos antígeno-anticuerpo (vía clásica), y el otro por el contacto de un complejo molecular en el que participa C3b con productos bacterianos, como son las endotoxinas (vía alterna). Ambas vías llevan a la formación de los mismos productos dado que confluyen en un intermediario común, una enzima llamada C3 convertasa, la cual cataliza la escisión de C3 en sus dos productos funcionalmente activos; C3a y C3b, los que a la vez continúan la cascada de activación de los sucesivos factores<sup>18</sup>.

#### **4. *Ácido araquidónico y sus derivados***

El ácido araquidónico es un compuesto abundante de las membranas celulares, que en condiciones normales está unido a los triglicéridos, pero puede ser separado de éstos bajo la acción de la enzima fosfolipasa A2. Una vez libre, el ácido araquidónico sufre una serie de transformaciones químicas bajo la acción de la enzima ciclooxygenasa, dando origen a las prostaglandinas PGG2 y PGH2, que son precursoras de los demás componentes de la familia de los prostanoïdes. Otro de los productos del ácido araquidónico son los leucotrienos, el que se produce por la acción de las lipooxygenasas. La fosfolipasa A2, encargada de liberar el ácido araquidónico, se activa por una diversidad de estímulos, ya sean, mecánicos, químicos, como también por la acción de otros mediadores químicos como la proteína C5a. Las prostaglandinas están involucradas en reacciones vasculares, como la vasodilatación, a cargo principalmente de PGI2, PGD2, PGE2, PGF2, también participa PGE2 en la mediación del dolor, y PGI2 como antiagregante plaquetario. Los prostanoïdes, en particular PGI2, liberados por el endotelio, también ejercen efectos vasodilatadores y antitrombóticos. Las dos prostaglandinas más importantes en los mecanismos inflamatorios son la PGE2 y PGI2, por producir vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular<sup>18</sup>.

Otro producto derivado de las prostaglandinas es el tromboxano, el cual es sintetizado en las plaquetas. Tiene como acción ser vasoconstrictor y agregante plaquetario, efecto inverso al de PGI2, que es sintetizada por el endotelio. La vía de las ciclooxygenasas da origen, como ya se describió anteriormente, a las prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano. Existen dos isoformas de la enzima que son reconocidas por sus iniciales COX-1, COX-2<sup>18</sup>.

En cuanto a la vía de las lipooxigenasas, se conoce que entre los leucotrienos algunos tienen acción quimiotáctica sobre los neutrófilos, como el LTB<sub>4</sub>, y otros están involucrados en reacciones alérgicas, donde predomina el aumento de la permeabilidad vascular, entre ellos LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>, que en conjunto forman la sustancia de reacción lenta de la anafilaxia. Un tercer derivado del ácido araquidónico es el factor activador de plaquetas<sup>18</sup>.

## **5. Citocinas**

Las citocinas son polipéptidos producidos principalmente por macrófagos y linfocitos. Ambas células son de aparición tardía en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Existen diversas citocinas, pero en la inflamación las más relevantes son la interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF) y la familia de la interleucina 8 (IL-8). La IL-1 actúa sobre endotelios y leucocitos, estimulando la síntesis y expresión de moléculas de adhesión. Estas favorecen la migración celular y estimulan en estas células la producción de factores de crecimiento, de otras citocinas y de óxido nítrico. El TNF alfa y beta, actúa sobre los neutrófilos produciendo agregación de ellos y sobre las células mesenquimáticas induciendo la liberación de enzimas proteolíticas. Las diversas formas de IL-8 son agentes estimulantes de la quimiotaxis y favorecen la activación de neutrófilos y la secreción de otras sustancias denominadas quemoquinas. La IL-1 y el TNF son liberados por macrófagos que se activan frente a la presencia de endotoxinas, complejos inmunes y toxinas, a la vez IL-1 estimula la secreción de IL-8. Con la activación de todos estos mediadores químicos se instala en el sitio de la injuria, una respuesta inflamatoria aguda. Si, por el contrario, la inflamación aguda es incapaz de eliminar la noxa, se activará otra respuesta más especializada<sup>18</sup>.



Los principales fármacos utilizados para tratar la inflamación son<sup>18</sup>:

-Fármacos que inhiben la enzima ciclooxigenasa: los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y los antiinflamatorios esteroideos (corticoides).

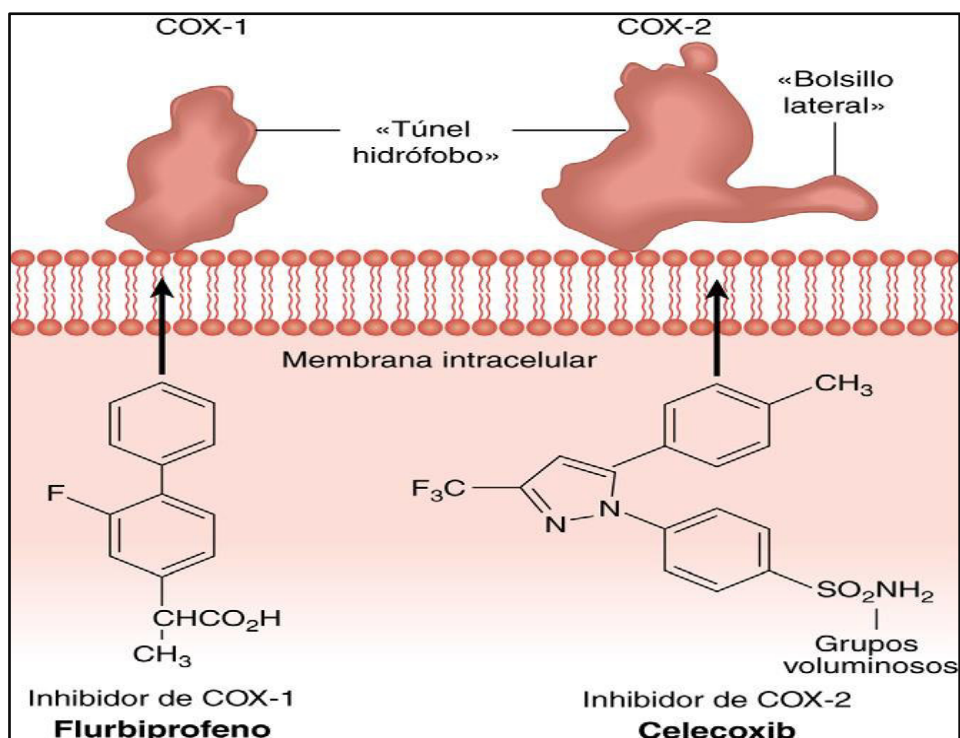
### **2.1.2.3 Tratamiento de la inflamación**

#### **2.2.2.3.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)**

##### **Inhibición de la ciclooxigenasa**

Los principales efectos terapéuticos de los AINES se derivan de su capacidad para inhibir la producción de PG (prostaglandinas), la cual se desarrolla a través de la inhibición de la oxidación del ácido araquidónico por las enzimas COX. Es así, que la primera enzima en la vía sintética de la PG es la COX, también conocida como PG G/H sintasa<sup>19</sup>.

Estas enzimas son bifuncionales, de modo que presentan dos actividades catalíticas diferentes. En la primera de ellas, la actividad dioxigenasa incorpora dos moléculas de oxígeno a la cadena de ácido araquidónico (u otro ácido graso que funcione como sustrato) en C11 y C15, lo que da lugar a un intermediario endoperóxido muy inestable, PGG<sub>2</sub>, que porta un grupo hidroxiperóxido en C15. La segunda, la actividad peroxidasa de la enzima, convierte a este intermediario en PGH<sub>2</sub>, con un grupo hidroxilo en C15, que es transformado posteriormente por una isomerasa, una reductasa o una sintasa, de manera específica para cada tipo celular en otros prostanoides<sup>20</sup>.



**Figura 4.** Esquema comparativo de los puntos de unión de ciclooxygenasa COX-1 y COX-2. El esquema muestra las diferencias en los puntos de unión de AINE de ambas isoformas. El punto de unión de la COX-2 se caracteriza por la existencia de un “bolsillo lateral” que puede acomodar grupos voluminosos, como la porción sulfonamida del celecoxib, el mismo grupo que impediría el acceso al sitio de la COX-1.

**Fuente:** Rang H. et al.<sup>20</sup>

Hay dos formas de COX, COX-1 y COX-2. La COX-1, que se expresa de manera inespecífica en la mayor parte de las células, es la fuente dominante de prostanoïdes para las funciones orgánicas, como la citoprotección epitelial gástrica y la hemostasia. Por el contrario, la COX-2, activada por las citocinas, las fuerzas de cizallamiento y los factores que favorecen tumores, es la fuente más importante de formación de prostanoïdes en la inflamación y tal vez del cáncer. Sin embargo, las dos enzimas contribuyen a la generación de prostanoïdes autoreguladores y hemostáticos y las dos pueden contribuir a la formación de prostanoïde en la inflamación humana y dolor. Es importante que la COX-1 se exprese como la isoforma inespecífica dominante en las células

epiteliales gástricas y se piensa que es la principal fuente de formación de PG citoprotectora<sup>19</sup>.

Por el contrario, la COX-2 es inducida en células inflamatorias cuando son lesionadas, infectadas o activas, por ejemplo, por las citocinas inflamatorias, como IL-1 y TNF- $\alpha$ <sup>20</sup>.

Tanto la COX-1 como la COX-2 contienen grupos hemo, y forman homodímeros unidos a membranas intracelulares. Desde el punto de vista estructural, ambas isoformas son semejantes ya que poseen un gran canal hidrófobo al que se anclan al ácido araquidónico y otros ácidos grasos para comenzar la reacción de oxigenación.

La mayoría de los AINEs inhiben solamente la reacción inicial de dioxigenación. Normalmente actúan como inhibidores “competitivos reversibles”, aunque el desarrollo cronológico de su acción presenta diferencias entre los miembros del grupo. Por lo general, estos fármacos inhiben rápidamente a la enzima COX-1, mientras que la inhibición de la COX-2 es más lenta, y a menudo irreversible. Para inhibir estas enzimas, los AINEs entran en el canal hidrófobo y forman enlaces de hidrógeno con un residuo de arginina de la posición 120, lo que impide el acceso de los ácidos grasos que actúan como sustratos en el dominio catalítico. Sin embargo, un solo cambio aminoacídico (isoleucina por valina en la posición 523) en la estructura de acceso del canal de la COX-2 crea un bolsillo lateral voluminoso que no existe en la COX-1. Esta diferencia es importante para comprender por qué algunos fármacos, presentan una selectividad mayor de la isoforma COX-2<sup>20</sup>.

Sin embargo, el ácido acetilsalicílico constituye una excepción a lo anteriormente expuesto. Esta molécula entra en el sitio activo y acetila la serina de la posición 530, lo que provoca una inactivación irreversible de la COX.

Se piensa que la acción antiinflamatoria (y probablemente, la mayor parte de las acciones analgésicas y antipiréticas) de los AINEs se relacionan con la inhibición de la COX-2, y que sus efectos adversos (particularmente los que afectan al tubo digestivo) se deben en gran medida a la inhibición de la COX-1.

También son objeto de estudio los efectos cardiovasculares de todos los AINEs cuando se toman durante un periodo prolongado.

El paracetamol es una excepción interesante a estereotipo general de los AINEs. Aunque es un analgésico y antipirético excelente, su actividad antiinflamatoria es ligera y parece estar restringida a algunos casos especiales (p. ej., la inflamación después de una extracción dental). Se ha demostrado que el paracetamol inhibe la biosíntesis de prostaglandinas en algunas situaciones experimentales (p. ej., durante la fiebre) pero no en otras<sup>20</sup>.

#### **2.2.2.3.2 Inhibición irreversible de la ciclooxigenasa por el ácido acetilsalicílico.**

El ácido acetilsalicílico modifica de manera covalente la COX-1 y la COX-2, inhibiendo en forma irreversible la actividad de la COX.

La duración del efecto de los AINEs diferentes al ácido acetilsalicílico, que inhibe los lugares activos de las enzimas COX en forma competitiva, se relaciona con la farmacocinética del fármaco. La importancia del recambio de enzimas en el restablecimiento de la acción del ácido acetilsalicílico es notable en las

plaquetas, las cuales, al no tener núcleo, tiene una capacidad muy limitada de síntesis de proteína. Por consiguiente, las consecuencias de la inhibición de la COX-1 de la plaqueta persiste durante la vida útil de la vida de la plaqueta. La inhibición de la formación de  $\text{TxA}_2$  dependiente de la COX-1 de la plaqueta es acumulativa con las dosis repetidas de ácido acetilsalicílico (una concentración de apenas 30mg/día) y tarda alrededor de ocho a doce días para restablecerse por completo una vez que se ha suspendido el tratamiento<sup>19</sup>.

#### **2.2.2.3.3 Aplicaciones terapéuticas**

Todos los AINEs, incluidos los inhibidores selectivos de la COX-2 son antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios, con excepción del paracetamol, que es antipirético y analgésico, pero en gran parte está desprovisto de actividad antiinflamatoria.

Los AINEs tienen su principal aplicación clínica como antiinflamatorios en el tratamiento de los trastornos musculoesqueléticos, como artritis reumatoide y artrosis<sup>17</sup>.

También producen alivio sintomático en enfermedades inflamatorias agudas: fracturas, esguinces, lesiones deportivas y otras lesiones del tejido blando. También son útiles para el tratamiento del dolor postoperatorio, dental y menstrual, y de las cefaleas y migrañas.

Sumado a ello, los AINEs reducen principalmente aquellos componentes de la respuesta inflamatoria e inmunitaria en las que las prostaglandinas, sintetizadas en su mayoría por la COX-2, desempeñan una función destacada. Entre ellas tenemos<sup>20</sup>:

- Vasodilatación (reduciendo la síntesis de las prostaglandinas vasodilatadoras).
- Edema (a través de una acción indirecta: la vasodilatación facilita y favorece la acción de algunos mediadores, como histamina, que aumentan la permeabilidad de las vénulas poscapilares<sup>20</sup>).

#### **2.2.2.3.4 Antiinflamatorios esteroideos (Corticoides)**

Reducen la activación de NF- $\kappa$ B, lo cual incrementa la apoptosis de las células activadas. Posee importancia en la regulación descendente de citoquinas proinflamatorias principales, como las interleucinas I y VI. Los linfocitos T se inhiben a partir de la síntesis de IL-2 y la proliferación de linfocitos T. Los neutrófilos y monocitos presentan quimiotaxia lenta y deficiente y una menor liberación de enzimas lisosómicas<sup>19</sup>.

### **2.2.3 Dolor**

#### **2.2.3.1 Definición**

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) define el dolor como: "Una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con una lesión hística real o potencial, o que se describe como ocasionada por dicha lesión"<sup>21</sup>. En esta definición el término **potencial** indica que, si el dolor se mantiene por un tiempo prolongado, la permanencia de la noxa provocará un daño tisular efectivo<sup>18</sup>.

#### **2.2.3.2 Clasificación**

El dolor se clasifica según: duración, patogenia, localización, etc.<sup>22</sup>

##### **A. Según el tiempo de evolución y duración:**

**Agudo (rápido):** Aparece inmediatamente luego de la activación de los nociceptores (0.1 s), por un estímulo térmico, químico o mecánico; tiene una

función de protección biológica; limitado en el tiempo y con escaso componente psicológico.

**Crónico (lento):** no aparece hasta pasado un mínimo de 1 s, ni posee una función protectora es limitado en su duración, se acompaña de componente psicológico. Es el dolor típico del paciente con cáncer <sup>22,23</sup>.

#### **B. Según su patogenia:**

**Neuropático:** Está producido por estímulo directo del SNC o por lesión de vías nerviosas periféricas. Se describe como punzante, quemante, acompañado de parestesias y disestesias, hiperalgesia, hiperestesia y alodinia.

**Nociceptivo:** Este tipo de dolor es el más frecuente y se divide en somático y visceral.

**Psicógeno:** Interviene el ambiente psico-social que rodea al individuo.

#### **C. Según la localización:**

**Somático:** Se produce por la excitación anormal de nociceptores somáticos superficiales o profundos (piel, musculoesquelético, vasos, etc.). Es un dolor localizado, punzante y que se irradia siguiendo trayectos nerviosos.

**Visceral:** Se produce por la excitación anormal de nociceptores viscerales. Este dolor se localiza mal, es continuo y profundo. Asimismo, puede irradiarse a zonas alejadas al lugar donde se originó. Frecuentemente se acompaña de síntomas neurovegetativos<sup>22</sup>.

### **2.2.3.3 Neuroanatomía.**

#### **A. Componentes periféricos.**

Se conocen cuatro tipos de neuronas periféricas relacionadas con la transmisión del impulso nervioso: las fibras A $\alpha$ ,  $\beta$ , A $\delta$  y C; siendo éstas dos últimas las vías del dolor; que corresponden a las neuronas de primer orden o nociceptor. Las

fibras A $\delta$  y C, se diferencian de las A $\alpha$  y  $\beta$ , por tener un umbral de estimulación alto<sup>18</sup>.

**Las Fibras A $\delta$ :** mielínicas, 1-5  $\mu\text{m}$  de diámetro, 4-30 metros por segundo ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) de velocidad media de conducción. Estas fibras conducen el dolor de corta latencia que precisa de respuestas rápidas. Responden a la estimulación química o térmica en forma proporcional con el grado de lesión tisular, y a estímulos mecánicos con umbrales mucho más altos que los mecanorreceptores de bajo umbral.

**Las Fibras C:** amielínicas, 0,3 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro; 0,4-2  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  de velocidad de conducción; son más numerosos e informan sobre sensaciones de dolor quemante y de latencia más larga. Son polimodales, es decir, responden a múltiples estímulos térmicos, mecánicos, químicos y también se activan por sustancias liberadas por el daño tisular, como la bradicinina, la histamina, acetilcolina y el potasio<sup>18,24</sup>.

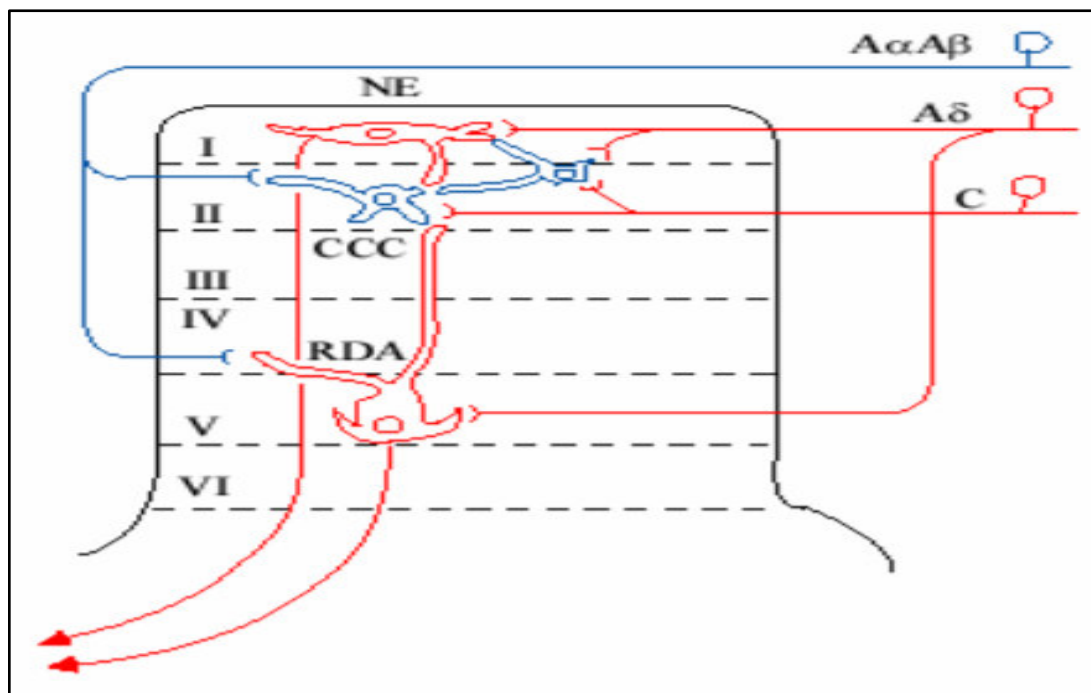
Por estas diferencias es que se percibe una doble percepción del estímulo doloroso, uno inicial leve bien focalizado, tipo picazón (A $\delta$ ) y otro profundo difuso de tipo quemadura<sup>18</sup>.

## **B. Componentes Centrales.**

Las fibras A $\delta$  y C cuyos somas están en el ganglio raquídeo ingresan al SNC por la asta posterior de la medula espinal (APME), ubicándose lateralmente en relación a la sustancia gris (SG), donde hacen sinapsis con una segunda neurona. La sinapsis de las neuronas periféricas y las segundas neuronas, cuyos somas se encuentran en el APME, se realiza en las láminas II (zona gelatinosa) y III (zona gelatinosa de Rolando)<sup>18</sup>.



El soma de la segunda neurona de esta vía puede estar ubicado en diferentes zonas APME; la lámina I de Rexed y el núcleo propio, que corresponde a las láminas IV, V y VI de Rexed. Las neuronas nociceptivas eferentes específicas tienen su soma en la lámina I mientras que las neuronas polimodales en el núcleo propio. A las láminas II y III también llegan colaterales de las fibras A $\alpha$  y  $\beta$ , Estas colaterales ingresan a la sustancia gris y sinaptan con interneuronas de la sustancia gelatinosa, las que modulan las sinapsis de las fibras A $\delta$  y C, con la segunda neurona. Las aferencias musculares sinaptan con neuronas de las láminas I, V y VI, y las aferencias viscerales lo hacen en las láminas I, V, VII y X. La segunda neurona puede sinaptar con más de una neurona periférica, neuronas de rango dinámico amplio, que poseen campos receptivos más extendidos que las neuronas nociceptivas específicas<sup>18</sup>.

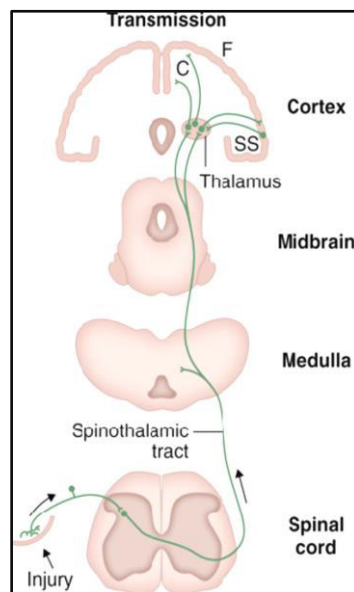


**Figura 5.** Esquema de la sinapsis en el asta posterior de la médula espinal  
NE: neuronas eferentes específicas. RDA: neurona de rango dinámico amplio. CCC: célula central de Cajal.

**Fuente:** Olguín M.<sup>18</sup>

### C. Vías ascendentes de la transmisión del dolor.

Las segundas neuronas que poseen sus somas en el APME, pueden dar origen a uno de los tres haces ascendentes de ubicación contralateral. El haz neoespinotalámico que hace sinapsis con los núcleos ventral posterior y pósterolateral del tálamo, y de allí con la corteza parietal o somestésica, en las áreas SI y SII, zona restringida de la corteza cerebral que tiene por función dar la ubicación topográfica del dolor. El haz paleoespinotalámico se proyecta en forma bilateral a los núcleos inespecíficos del tálamo y



**Figura 6.** Ruta ascendente de la transmisión del dolor.

luego a zonas frontales de la corteza, adquiriendo

**Fuente:** Toro V.<sup>12</sup>

importancia en la evaluación cualitativa del dolor. El haz espinoreticulotalámico, las fibras que hacen sinapsis con la formación reticular a diferentes niveles: bulbo, protuberancia, zona reticular mesencefálica y sustancia gris periacueductal y de allí en forma bilateral hacia los núcleos inespecíficos del tálamo, terminando en corteza inespecífica y distribuyéndose ampliamente en ella. Este haz es el que aporta el componente afectivo del dolor<sup>18</sup>.

### D. Neurotransmisores y neuromoduladores de la nocicepción

Los nociceptores no solo tienen una función receptora, sino que también producen la liberación de neurotransmisores desde las terminaciones nerviosas, entre estos, la sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y el glutamato. Estas sustancias se liberan en las cercanías de los vasos sanguíneos de pequeño calibre lo que provoca una vasodilatación y extravasación plasmática de bradicinina lo que trae un aumento en la producción

de histamina desde los mastocitos y de serotonina desde las plaquetas, con la consecuente aparición de edema. Además, frente a un daño celular, se desencadena una serie de sucesos que producen la activación de los terminales nociceptivos aferentes con liberación de potasio, síntesis de bradicinina del plasma, y síntesis de prostaglandinas en la región del tejido dañado, que a la vez aumentan la sensibilidad del terminal a la bradicinina y otras sustancias productoras del dolor. Tanto la histamina como de serotonina son capaces de activar poderosos nociceptores.

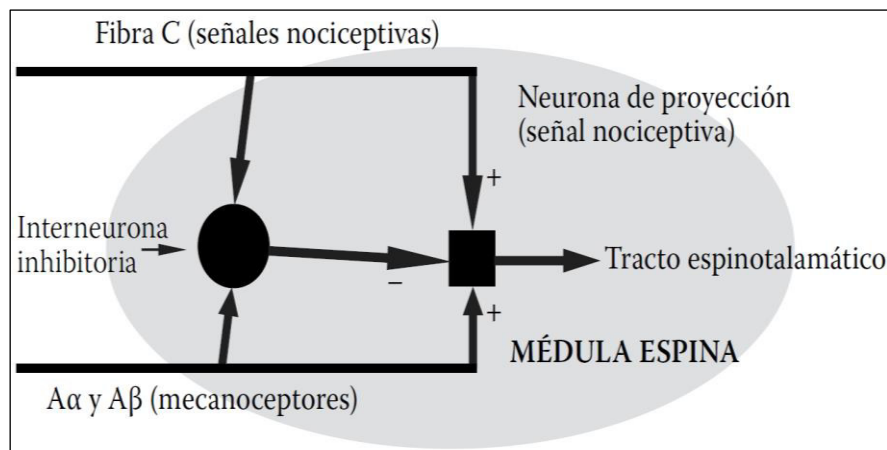
La liberación de histamina combinada con liberación de sustancia P aumenta la permeabilidad vascular. El aumento local de histamina y serotonina, por la vía de activación de nociceptores ocasiona un incremento de la sustancia p que autoperpetúa el estímulo doloroso. Los niveles de histamina y serotonina aumentan en el espacio extracelular, sensibilizando secundariamente a otros nociceptores y es lo que produce la hiperalgesia<sup>18</sup>.

## **E. Modulación inhibitoria de la nocicepción**

### **a.-Inhibición segmentaria**

En 1965, Melzack y Wall propusieron la “teoría de puerta del control del dolor” esta teoría propone que la transmisión del impulso doloroso puede ser disminuida o bloqueada. El desarrollo del estímulo de nervio eléctrico transcutáneo (TENS) fue la consecuencia clínica de este fenómeno<sup>24,25</sup>.

A las láminas I y V del cuerno dorsal medular llegan estímulos de fibras nociceptivas, que corresponden a las fibras A $\delta$  y C, y fibras no nociceptivas, que corresponden a las A $\alpha$  y  $\beta$ . Estas últimas activan interneuronas inhibitorias de la lámina II, que inhiben la descarga de las neuronas de la lámina V y, por tanto, la salida de la información nociceptiva (“Puerta cerrada”). Las fibras A $\delta$  y C causan la excitación de las neuronas de la lámina V y al mismo tiempo inhiben las Interneuronas inhibitorias de la lámina II, lo que permite la salida de la información nociceptiva (“Puerta abierta”)<sup>24</sup>.



**Figura 7.** Representación de la Teoría del control de puerta del dolor (Melzack y Wall). +: sinapsis estimulante; -: sinapsis inhibitoria.

**Fuente:** Patel N.<sup>25</sup>

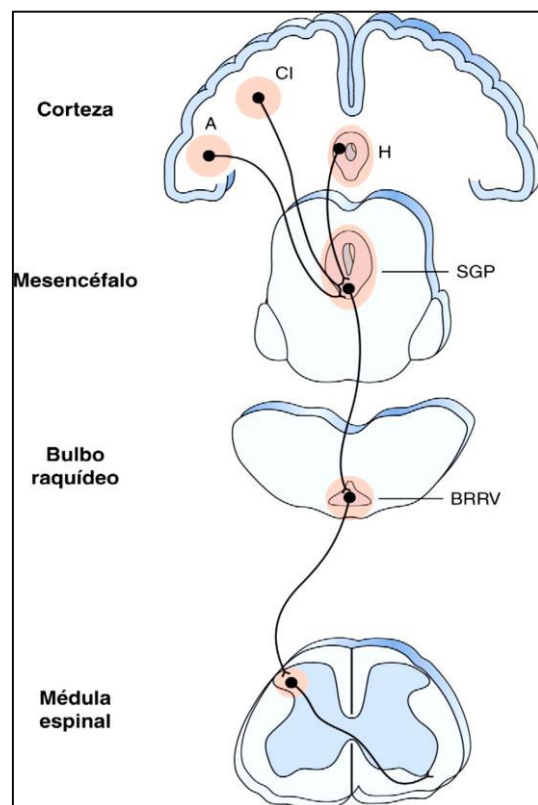
## b. Sistema opiáceo endógeno

Además de la compuerta de transmisión de estímulos nocivos, otro sistema modula la percepción del dolor. Desde el año 4,000 a.C., se sabe que el opio y sus derivados, como morfina, codeína y heroína son analgésicos potentes y hoy en día permanecen en el pilar de la terapia de alivio del dolor. En los años 1960 y 1970, los receptores para los derivados del opio fueron encontrados, sobre todo en las células nerviosas de la materia gris periacueductal y la medula ventral, así como en la medula espinal. Este descubrimiento implicó que los

productos químicos deben ser producidos por el sistema nervioso que son ligandos naturalmente a estos receptores. Tres grupos de compuestos endógenos (encefalinas, endorfinas y dinorfinas) han sido ligados a los receptores opiáceos y se mencionan como el sistema opiáceo endógeno. La presencia de este sistema y el sistema descendente de modulación de dolor (adrenérgico y serotoninérgico) proporcionan una explicación del sistema de modulación interna del dolor y su variabilidad subjetiva<sup>25</sup>.

### c. Sistema nervioso inhibitorio descendente

Este sistema puede ser activado por diferentes estímulos (estrés, dolor, estimulación eléctrica o administración de opiáceos), y desde un punto de vista bioquímico consta de un primer componente opioide, integrado por las encefalinas y de un segundo constituyente, aminérgico, constituido por la noradrenalina y la serotonina del que se derivan efectos aditivos y sinérgicos. Anatómicamente, funciona a tres niveles, mesencéfalo, bulbo y médula espinal. Las regiones cerebrales involucradas en la modulación intrínseca del estímulo doloroso incluyen a la corteza somatosensorial, el hipotálamo, el



**Figura 8.** Sistema descendente de control del dolor y lugar de acción de los opioides. CI, corteza insular; A, la amígdala; H, hipotálamo; SGP, sustancia gris periacueductal; BRRV, bulbo raquídeo rostro ventral. Las áreas rosadas indican regiones que expresan receptores opioides  $\mu$ .

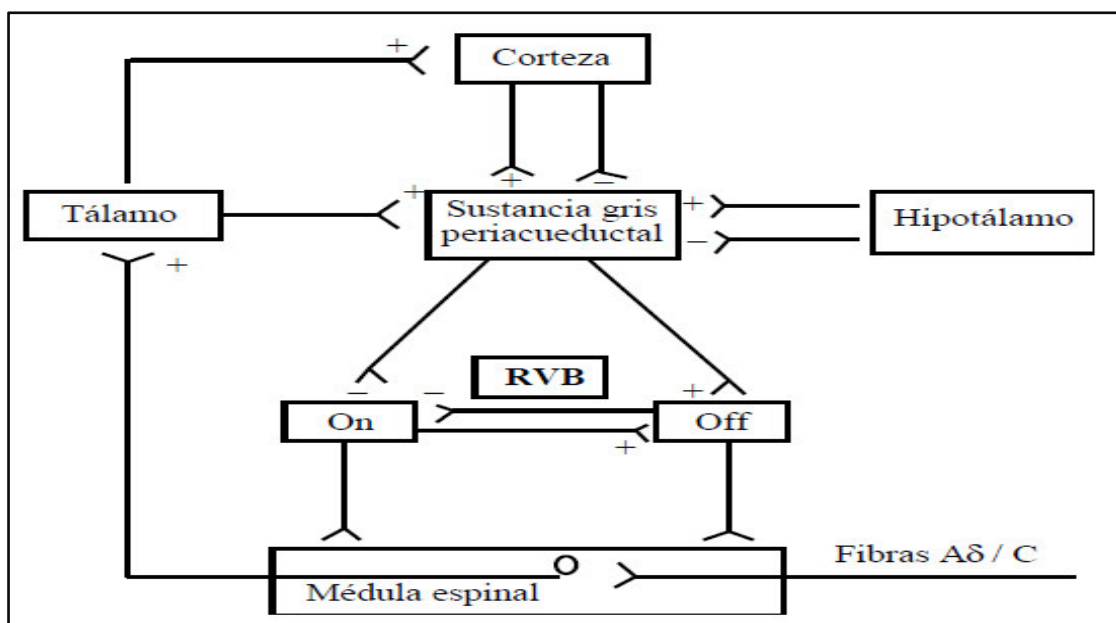
**Fuente:** Rang H. et al.<sup>20</sup>

mesencéfalo, la sustancia gris periacueductal y el rafe magnus. Desde estas estructuras centrales las fibras descienden por el cordón dorsolateral a la médula espinal, enviando proyecciones a las láminas I y V<sup>26</sup>.

La SGP recibe impulsos de otras muchas regiones del encéfalo, como el hipotálamo, la amígdala y la corteza; en primer lugar, la SGP se proyecta hacia el bulbo raquídeo rostroventral (BRRV), y a continuación hacia el APME. Dos importantes neurotransmisores en esta vía son la 5-hidroxitriptamina (5-HT) y las encefalinas que actúan de forma directa o indirecta inhibiendo la descarga de las neuronas espinotalámicas, a través de las interneuronas<sup>20</sup>.

El BRRV no se comporta como un mero lugar de transición de la modulación nociceptiva y ella misma adquiere un especial protagonismo que está siendo cada vez mejor conocido. El hallazgo más notable ha consistido en caracterizar dentro del BRRV de la rata dos sistemas neuronales con actividad contrapuesta: el sistema de células “on” y el sistema de células “off”. El primero incrementa su actividad cuando se aplica un estímulo nociceptivo periférico y permanece activo todo el tiempo que dura la respuesta motora refleja al estímulo; el segundo se caracteriza por interrumpir su actividad inmediatamente antes de que se produzca la respuesta refleja (p.e. reflejo de retirada). Ambos sistemas

mantienen una actividad tónica, de carácter alternante, de manera que la actividad de uno de ellos coincide con la inactividad del otro<sup>26</sup>.

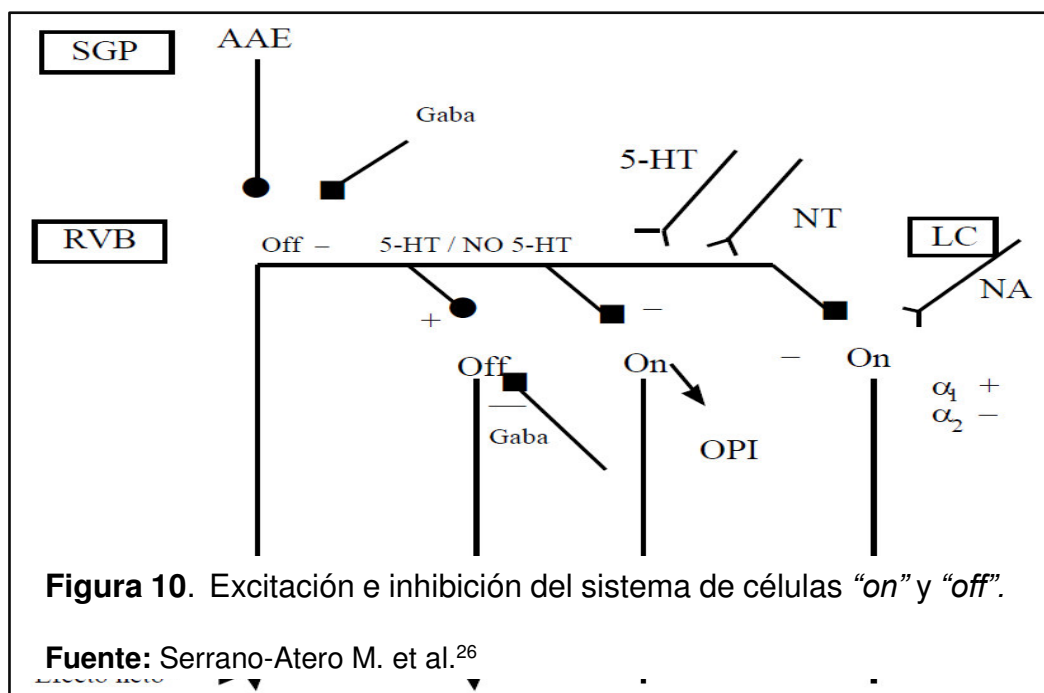


**Figura 9.** Organización del sistema analgésico endógeno que modula la transmisión nociceptiva en la asta posterior de la médula espinal y el sistema de células “on” y “off”. Bulbo raquídeo rostro ventral (RVB).

**Fuente:** Serrano-Atero M. et al.<sup>26</sup>

proyectan a la RVB y excitan células “on” que ejercen un efecto neto inhibitorio sobre la transmisión nociceptiva en el asta dorsal. Las células “off”, algunas de las cuales contienen 5-HT, se proyectan extensamente en la RVB. Las células “off” estimulan otras células “off” e inhiben células “on”. Las células “on” proyectan al asta dorsal, donde ejercen un efecto neto facilitador de la transmisión nociceptiva. Las células “on” son inhibidas directamente por neuronas que contienen péptidos opioides (OPI). Algunas de las células “on” inhibidas por OPI contienen GABA y algunos de sus axones colaterales inhiben células “off”. De este modo, un opiáceo puede desinhibir a las células “off”. Otras neuronas extrínsecas contienen neurotensina (NT) o noradrenalina (NA),

proveniente del *locuscoeruleus* (LC), y 5-HT de los núcleos del rafe. La NA puede ejercer una acción excitadora  $\alpha_1$  o inhibitoria  $\alpha_2$ <sup>26</sup>.



#### 2.2.3.4 Tratamiento del dolor.

El alivio del dolor es un principio básico, fundamental en la buena práctica médica. El alivio de dolor depende, en gran medida, de la comprensión de los elementos, anatómicos, fisiológicos, bioquímicos y psicológicos subyacentes a esta experiencia sensorial.

Los fármacos pueden aliviar el dolor por mecanismos muy diversos; sin embargo, tradicionalmente solo se considera analgésicos a los medicamentos que pertenecen a algunos de los siguientes grupos: 1) analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), cuyo prototipo es el ácido acetilsalicílico, y 2) analgésicos opioides, que por sus acciones sobre los receptores endorfinérgicos (opioideos) se clasifican en agonistas (morfina) agonistas-antagonistas(nalbufina). Además de los AINE y opioides, se dispone de los

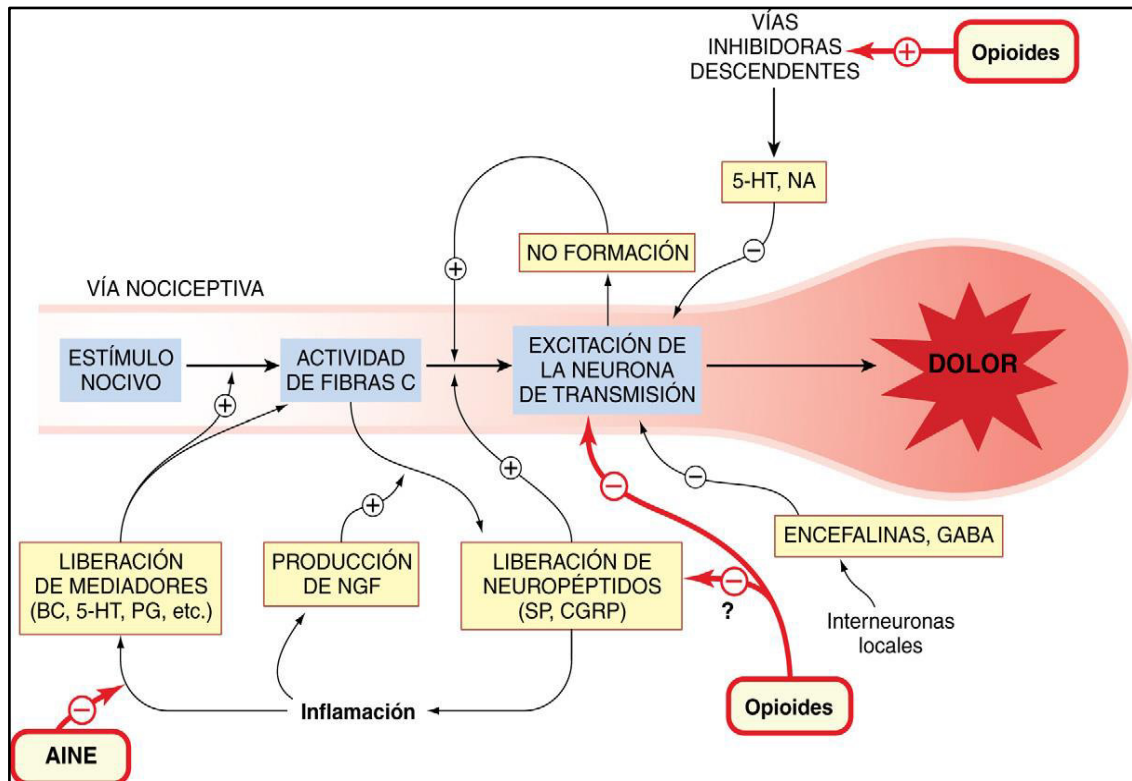


denominados adyuvantes de la analgesia, que en algunos tipos de dolor como el neuropático, contribuyen sustancialmente a su alivio; entre ellos están algunos antidepresivos tricíclicos y algunos anticonvulsivos. El dolor también se puede aliviar con anestésicos locales, anticolinérgicos, y relajantes del músculo estriado<sup>27</sup>.

**AINEs:** se les considera de forma convencional analgésicos periféricos, ya que su sitio de acción principalmente se sitúa allí donde se genera el estímulo doloroso, y sus propiedades farmacológicas se derivan por su capacidad de inhibir la enzima ciclooxigenasa, en consecuencia, la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos mas no de leucotrienos. Las prostaglandinas producto del daño tisular (inflamación), sensibilizan los receptores de dolor a la estimulación mecánica y a estimulación química de numerosos productos endógenos con propiedades algésicas (sustancia P, serotonina, bradicinina, histamina)<sup>27,28</sup>.

**Opioides:** considerados de forma convencional como analgésicos de acción central, a diferencia de los AINEs, su sitio de acción primaria es el SNC y producen analgesia porque reducen o modifican el componente afectivo o emocional de la experiencia dolorosa. Su efecto analgésico depende de su unión a sitios específicos la membrana neuronal (receptores mu [ $\mu$ ], kappa [K], delta [ $\delta$ ]) propios de ligandos endógenos (endorfinas)<sup>27</sup>. Denominados también MOR, KOR y DOR respectivamente, pertenecen a la familia de receptores con 7 segmentos transmembrana, acoplados a proteína G<sup>29</sup>.

La unión del opioide al receptor provoca, mediante acción de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, la inhibición de la adenilciclasa, responsable de la transformación de ATP en AMP cíclico (AMPc), disminuyendo así las concentraciones de AMPc intracelular. Por otra parte, las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  de la proteína G actúan modulando los canales de potación y calcio<sup>29</sup>.



**Figura 11.** Resumen de las dianas donde actúan los principales fármacos analgésicos. AINE, antiinflamatorio no esteroideo; BC, bradisinina; CGRP, péptido relacionado con el gen de la calcitonina; GABA, ácido gammaaminobutírico; 5-HT, 5-hidroxitriptamina; NA, noradrenalina; NGF, factor de crecimiento nervioso; NO, óxido nítrico; PG, prostaglandinas; SP, sustancia P.

**Fuente:** Rang H. et al.<sup>20</sup>

**Tabla 1.** Escala analgésica según la Organización Mundial de la salud.

<b>Paso 1.</b> Dolor leve a moderado
<p>No opioide ± fármaco complementario.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Se debe utilizar paracetamol o un AINEs, a menos que haya contraindicaciones. Los fármacos complementarios son los que intensifican la eficacia analgésica, tratan los síntomas concomitantes que exacerban el dolor, o proporcionan actividad analgésica independiente para tipos específicos de dolor.</li></ul>
<b>Paso 2.</b> Dolor leve a moderado o dolor que no controlado después del paso 1
<p>Opioide de acción leve si es necesario ± no opioide las 24 h (ATC) ± fármaco complementario.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Se debe añadir morfina, oxicodona o hidromorfona al paracetamol o a un AINE para una máxima flexibilidad de la dosis de opioide.</li></ul>
<b>Paso 3.</b> Dolor moderado a intenso o dolor que no se controla después del paso 2
<p>Opioide de liberación sostenida / acción prolongada ATC o infusión continua + opioide de acción breve según sea necesario ± no opioide ± fármaco complementario.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Hay indicaciones para oxicodona, morfina, oximorfona o fentanilo transdérmico de liberación sostenida.</li></ul>

**Fuente:** Hilal-Dandan R., Brunton L.<sup>28</sup>

**Tabla 2.** Tratamiento del dolor

Fármacos útiles en el tratamiento de dolor.	
<b>AINE</b> Inhibidores de la COX <sub>1,2</sub> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Acetaminofén</li> <li>✓ AAS</li> <li>✓ Naproxeno</li> <li>✓ Diclofenaco</li> <li>✓ Dipiridona</li> <li>✓ ketorolaco</li> </ul> Inhibidores de la COX <sub>2</sub> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Celecoxib</li> </ul> <b>Opioides</b> Agonistas <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Morfina</li> <li>✓ Codeína</li> <li>✓ Levorfanol</li> <li>✓ Hidromorfona</li> <li>✓ meperidina</li> <li>✓ Metadona</li> <li>✓ Oximorfona</li> <li>✓ Propoxifeno</li> <li>✓ Tramadol</li> <li>✓ Fentanilo (parche transdérmico)</li> </ul>	<b>Agonistas-antagonistas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Nalbufina</li> <li>✓ Butorfanol</li> <li>✓ Buprenorfina</li> </ul> <b>Antagonistas</b> Naloxona <b>Adyuvantes de la analgesia</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Carbamazepina</li> <li>✓ Fenitoina</li> <li>✓ Nortriptilina</li> </ul> <b>Anestésicos locales</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Lidocaína</li> <li>✓ Benzocaína</li> </ul> <b>Anticolinérgicos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Atropina</li> <li>✓ Butilhioscina</li> <li>✓ Oxibutinina</li> <li>✓ Tolterodina</li> </ul> <b>Relajantes musculares</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Metocarbamol</li> <li>✓ Baclofeno</li> <li>✓ Carisoprodol</li> <li>✓ Orfenadrina</li> </ul>

**Fuente:** Rodríguez R.<sup>27</sup> y Hilal-Dandan R., Brunton L.<sup>28</sup>

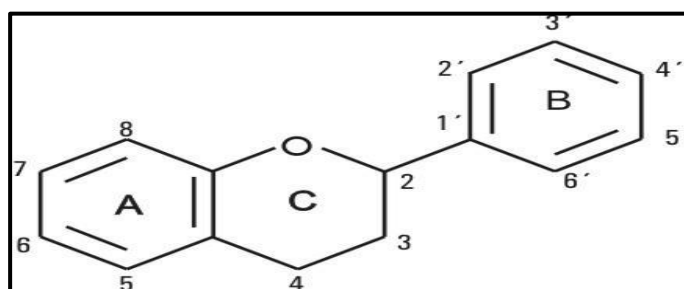
#### 2.2.4 Flavonoides

Conocidos también como antotaxinas son uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos<sup>30</sup>, se encuentran prácticamente en todas plantas superiores (hojas, flores y frutos)<sup>31</sup>. Aunque su presencia en las algas no se ha

demostrado hasta el momento, sin embargo, son frecuentes en Bryophytas (Musgos y Hepáticas). En Pteridophytas no es mayor la variedad estructural de flavonoides, las Psylitales y Selaginellales se caracterizan por la presencia de biflavonoides, las Equisetales por la de antocianidoles. En los Helechos predominan los O-heterósidos pero también se puede encontrar chalconas y proantocianidoles. En Gymnospermas, los proantocianidoles son bastante constantes, se observa la presencia en Cycadales y Coníferas (excepto Pinaceae); de biflavonoides, ausentes en Gnetales. Son responsables de la coloración de flores, frutos y hojas, si no son directamente visibles contribuyen a la coloración por su papel de copigmentos<sup>32</sup>.

#### 2.2.4.1 Biosíntesis de los flavonoides.

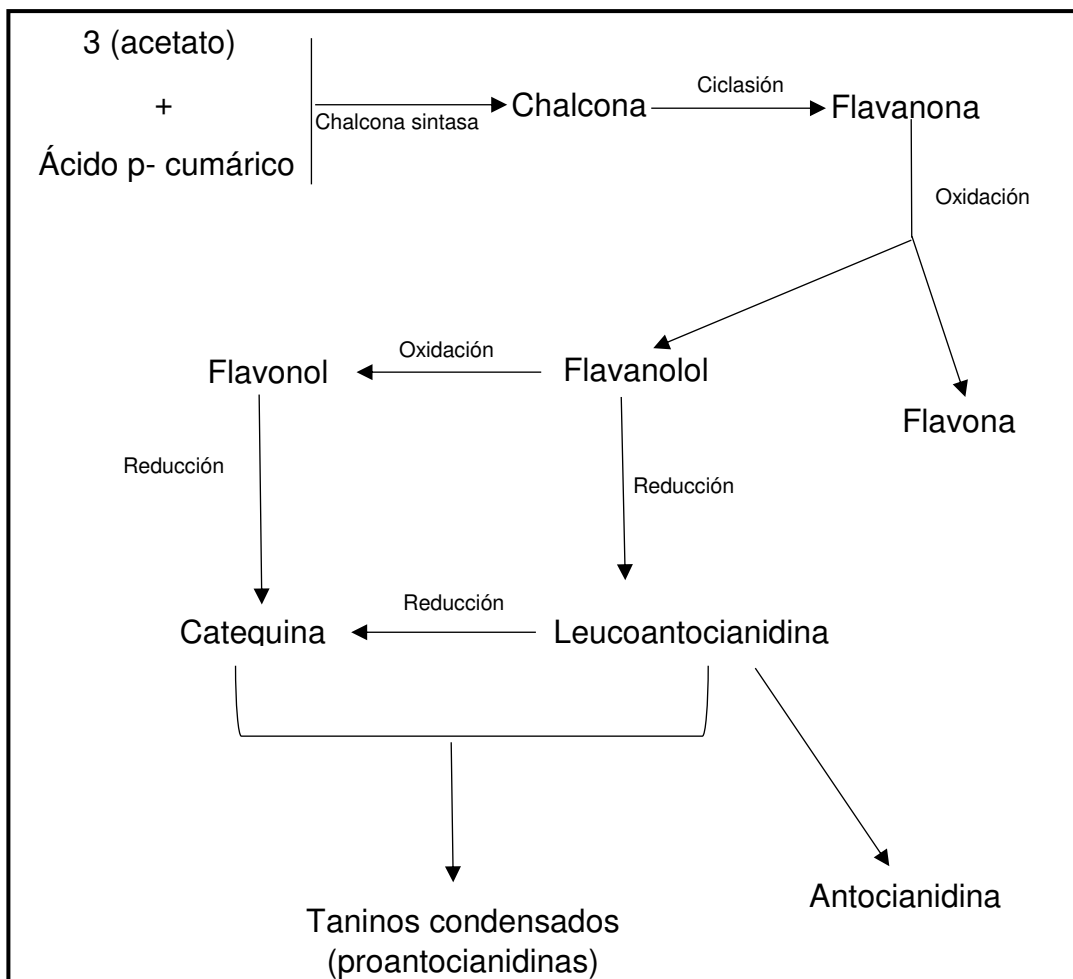
Todos los flavonoides (más de 4000) poseen un origen biosintético común y por este motivo un mismo elemento estructural básico<sup>32</sup>. Todos están conformados por 15 átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> en el cual dos anillos aromáticos están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C<sup>30</sup>.



**Figura 12.** Núcleo básico de los flavonoides (Difenilpirano). El anillo heterocíclico C se denomina pirano.

**Fuente:** Lock O<sup>30</sup>

Se forman biogenéticamente a través de la ruta del shikimato y del acetato malonato, siendo la chalcona el precursor a partir de la cual se derivan los demás<sup>30</sup>. La reacción química de la formación de la chalcona es controlada por las enzimas: chalcona sintasa y chalcona flavona isomerasa<sup>33</sup>.



**Figura 13.** Síntesis biogénica de los flavonoides.

**Fuente:** Kuklinski C.<sup>31</sup>

#### 2.2.4.2 Clasificación de los flavonoides

En función de sus características estructurales los flavonoides se pueden clasificar en seis principales grupos: los flavanos, como la catequina, con un grupo-OH en posición 3 del anillo C; los flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo-OH en

posición 3 del anillo C; las flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3; las antocianidinas, como la cianidina, que tienen unido el grupo-OH en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C; las isoflavonas, representados por la Genisteína que tiene dos grupos-OH unidos en la posición 1 y 3 del anillo C y los flavanonoles, principalmente destaca la taxifolina, la cual se caracteriza por la unión de un grupo-OH al carbono 1,2 y 3 del anillo C<sup>33</sup>.

#### **2.2.4.3 Propiedades farmacológicas.**

Desde que el científico húngaro Albert Szent-Györgyi (ganador del premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1937) los descubriera y les diera el nombre de «vitamina P», se han descrito para los flavonoides propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antihemorrágicas, vasodilatadoras (proantocianidinas de Crataegus, Arnica y Gingko) , antineoplásicas, contra la fragilidad capilar (bioflavonoides del género Citrus: Rutina), espasmolítica (glicósidos de apigenina), colerética, estrógena, diurética, neuroprotectora, mejora el rendimiento cognitivo, antivirales, antibacterianas (flavonoides prenilados y otros fenoles), antialérgicas, hepatoprotectora (silimarina de Silybum), fungitóxica (isoflavonas de Lupinus)<sup>30-36</sup>.

**Tabla 3.** Potenciales efectos farmacológicos de diferentes flavonoides en humanos y animales.

ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS	COMPUESTOS
Analgésica	Quercetina, hesperidina, miricitrina, 5,7-dimetoxi-flavanona-4'-O-[β-D-apiofuranosil-(1→2)]-β-D-glucopiranosido, 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxi-chalcona-4-O-β-D-glucopiranosido.
Antialérgica	Quercetina.
Antiaterogénica	Quercetina.
Anticancerígena	Baicaleína, epigallocatequina, kaenferol-3-O-β-D-glucopiranosido, nobiletina, quercetina, rutina, tangeretina, tricina, woogonina.
Antidiabética	Quercetina.
Antidiarréica	Apigenina, kaenferol, morina, miricetina, naringenina, quercetina, quercitrina.
Antihepatotóxica	Gospina, hispidulina, hidroxietilrutósido, kolavirona, quercetina, silimarina.
Antiinflamatoria	Apigenina, crisina, gospina, hibrifolina, hipolaetina-8-β-D-glucósido, luteolina, miricetina, nepetina, quercetina, quercitrina, rutina, sidertoflavonona.
Antiosteoporótica	Ipriflavona.
Antiespasmódica	Apigenina, crisina, kaenferol, quercetina.
Antiulcerosa	Hipolaetina-8-glucósido, kaenferol, quercetina, rutina, solona, naringina.
Protector Vascular	Antocianidina, citrina, rutósido.

**Fuente:** Bonkanka C.<sup>37</sup>

### 2.2.5 Alcaloides

Los alcaloides son sustancias orgánicas con carácter básico y mayoritariamente de origen vegetal. Se caracterizan, generalmente, por tener una estructura compleja y por ejercer acciones fisiológicas diversas inclusive a dosis muy bajas. Son tóxicos y capaces de precipitar con ciertos reactivos característicos. Sin embargo, existen determinadas sustancias que se consideran alcaloides y que no cumplen con las características generales mencionadas.

A nivel de estructura química, son un grupo muy heterogéneo de compuestos con estructuras muy variadas. Todos contienen C, H y N. Algunos tienen oxígeno



y poco azufre. El nitrógeno presente puede formar parte de un ciclo (N-heterocíclico; el más común) o no (con N no heterocíclico, como la estricnina, colchicina)<sup>31</sup>.

La presencia de uno o más átomos de nitrógeno como parte del sistema cíclico, manifiestan significativamente la actividad farmacológica y han sido biosintetizados de aminoácidos como precursores, a los cuales se les denomina alcaloides verdaderos, los mismos que se diferencian de los protoalcaloides o aminas biológicas, como las alquilaminas, biosintetizadas también de aminoácidos y de los pseudoalcaloides, aquellos que también poseen nitrógeno en un ciclo, pero no son originados por aminoácidos como por ejemplo, los derivados de purina y los esteroalcaloides<sup>30</sup>.

#### **2.2.5.1 Propiedades físico-químicas**

Los alcaloides que carecen de oxígeno, son líquidos a temperatura ambiente y son frecuentemente volátiles, presentando un olor característico. Por otro lado, los alcaloides oxigenados suelen ser sólidos cristalizables y generalmente incoloros o blancos. Todos, en general, son amargos. En su forma libre, son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos polares (alcoholes) y apolares (éter, cloroformo, hexano), aunque hay excepciones como las bases xánticas y sales de amonio cuaternarias que son solubles en agua. Todos los alcaloides que están en forma de sal son solubles en agua y mezclas hidroalcohólicas e insolubles en disolventes orgánicos apolares. En mezclas hidroalcohólicas (HA), como por ejemplo etanol al 70 % son solubles tanto la forma libre como la sal. La solubilidad depende si el alcaloide tiene el grupo amino libre o si esta salificado<sup>31</sup>.

**Tabla 4.** Solubilidad de los alcaloides.

<b>Alcaloide</b>	<b>Agua</b>	<b>Alcohol</b>	<b>Mezcla HA</b>	<b>Disolvente orgánico apolar</b>
<b>Base libre</b>	Insoluble	Soluble	Soluble	Soluble
<b>Sal</b>	Soluble	Soluble	Soluble	Insoluble

**Fuente:** Kuklinski C.<sup>31</sup>

La mayoría de los alcaloides tienen actividad óptica siendo las formas levóginas (l, -) más activas que las dextróginas (d, +). El nitrógeno de su estructura, que suele pertenecer a un ciclo, posee carácter más o menos básico <sup>22</sup>. La basicidad de los alcaloides es muy variable y esta propiedad se encuentra estrechamente ligada a la disponibilidad del doblete libre de nitrógeno. Los agrupamientos electro-atrayentes adyacentes del átomo de nitrógeno disminuyen la basicidad, los grupos electro-donadores la exaltan: colchicina y piperina, las cuales, debido a la existencia del carbonilo de la amida, son prácticamente neutros.

El sistema heterocíclico puede poseer por sí mismos una basicidad variable: así en la piridina-con seis electrones  $\pi$ , y también en la quinoleína e isoquinoleína, el doblete del nitrógeno está disponible y su basicidad es manifiesta. En el caso del pirrol o del indol, el doblete del nitrógeno participa en la aromaticidad por lo que no son básicos (incluso tienen cierto carácter ácido)<sup>31</sup>.

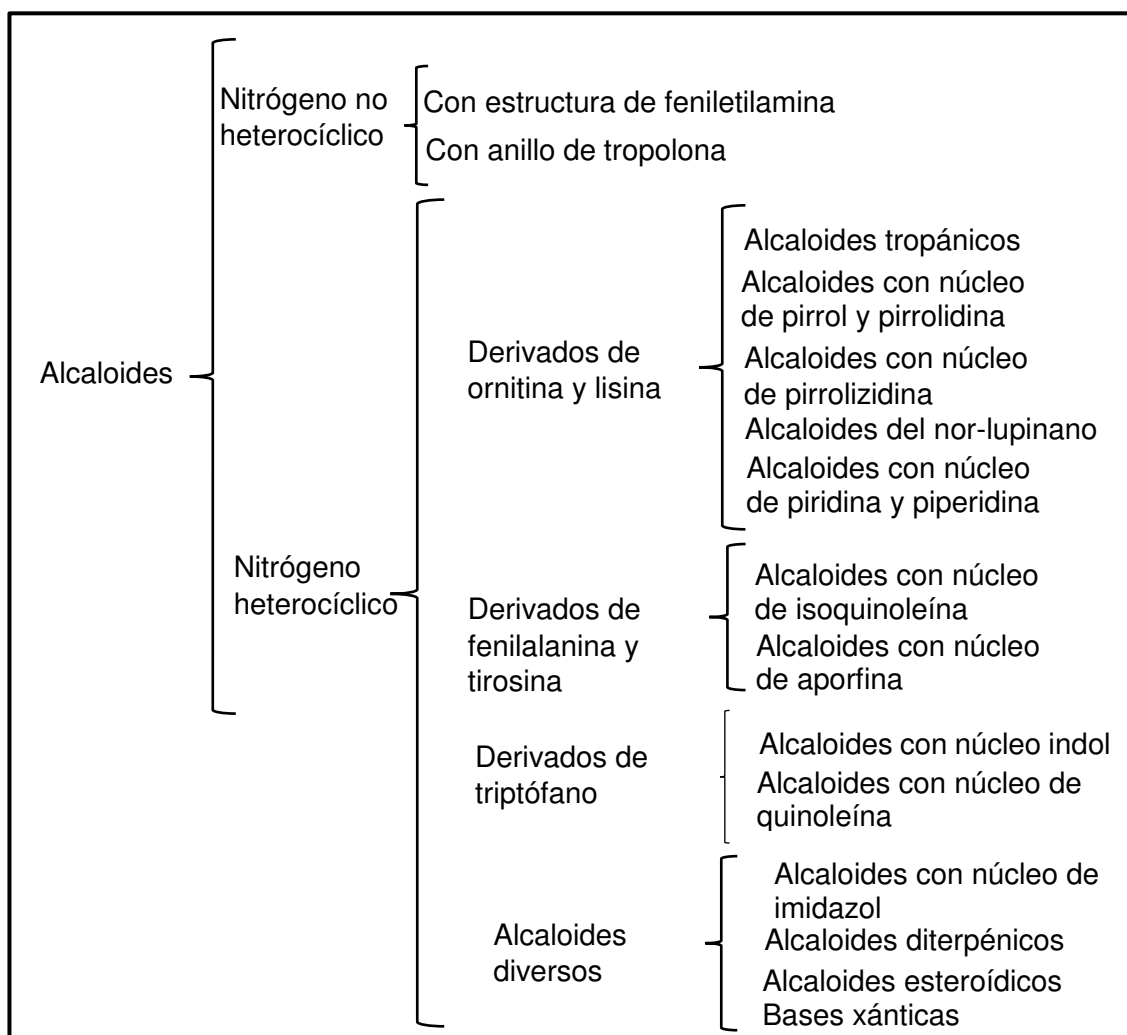
### 2.2.5.2 Clasificación

La clasificación de los alcaloides se puede hacer en base a su estructura y en base a su origen. A continuación, se realiza una clasificación que tiene en cuenta estos dos aspectos:

A.-Con nitrógeno no heterocíclico

B.-Con nitrógeno heterocíclico

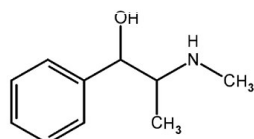
Dentro de cada uno se ordenan en base a su estructura química y a su origen biosintético<sup>31</sup>. La clasificación se resume en la siguiente figura:



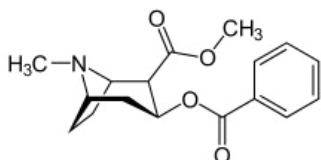
**Figura 14.** Clasificación de alcaloides en base a su estructura química y origen biosintético.

**Fuente:** Kuklinski C.<sup>31</sup>

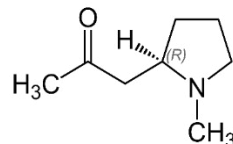
**Alcaloide con nitrógeno  
no heterocíclico: efedrina**



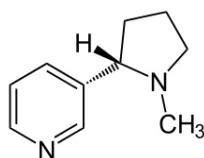
**Alcaloides con nitrógeno heterocíclico**  
**Derivado de ornitina y lisina**



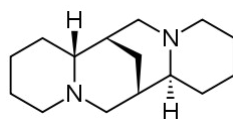
Alcaloides tropánico:  
**cocaína**



Alcaloide con núcleo  
de pirrolidina: **higrina**

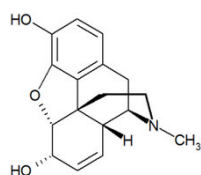


Alcaloide con núcleo  
de piridina: **nicotina**

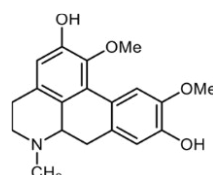


Alcaloide con núcleo de  
quinolizidina: **esparteína**

**Derivados de la fenilalanina y tirosina**

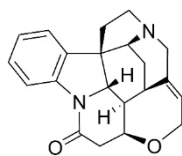


Alcaloides  
isoquinoleínicos: **morfina**

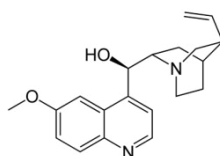


Alcaloide con núcleo  
de aporfina: **boldina**

**Derivados del triptófano**

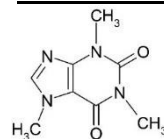


Alcaloides  
indólicos:  
**estricnina**



Alcaloides  
quinoleínicos:  
**quinina**

**Alcaloides  
de diversos**



Base xántica:  
**cafeína**

**Figura 15.** Ejemplos de los principales alcaloides.

**Fuente:** Kuklinski C.<sup>31</sup>

La función de los alcaloides en las plantas no es muy conocida, como ocurre con la mayoría de los productos naturales. Sin embargo, se reporta que algunos intervienen como reguladores de crecimiento, repelentes o atractores de insectos. A continuación, se detalla en la Tabla 5 la acción fisiológica de algunos de ellos<sup>31</sup>:

**Tabla 5.** Principales alcaloides en el comercio.

Alcaloides	Acción fisiológica
Atropina	Antiespasmódico, estimulante, analgésico
Cocaína	Estimulante, anestésico local, sedante
Codeína	Analgésico, sedante. hipnótico
Emetina	Emético, expectorante, antipirético, amebicida
Escopolamina	Hipnótico, sedante
Esparteína	Estimulante cardíaco, diurético
Hiosciamina	Hipnótico, sedante cerebral, midriático
Morfina	Narcótico, sedante hipnótico, analgésico
Quinina	Tónico, emenagogo, antiséptico, antipirético
Efedrina	Vasoconstrictor, asma, insuficiencia circulatoria
Papaverina	Relajante muscular
Lobelina	Expectorante, emético, estimulante respiratorio
Reserpina	Control de la presión alta de la sangre
Tubocurarina	Relajante muscular

**Fuente:** Lock O.<sup>30</sup>

### 2.2.5.3 Acción farmacológica

Los alcaloides son sustancias que poseen especial interés por sus actividades farmacológicas que se ejercen sobre los campos más variados:

- A nivel del sistema nervioso central, ya sean depresores (morfina, escopolamina) o estimulantes (estricnina, cafeína).
- A nivel del sistema nervioso autónomo: simpaticomiméticos (efedrina) o simpaticolíticos (yohimbina, algunos alcaloides del cornezuelo de centeno), parasimpaticomiméticos (eserina, pilocarpina), anticolinérgicos (atropina, hiosciamina), gangliopléjicos (esparteína, nicotina).

Se tiene también los curarizantes, anestésicos locales (cocaína), antifibrilantes (quinidina), antitumorales (vinblastina, elipticina), antipalúdicos (quinina), amebicidas (emetina).

Estas diferentes actividades conducen a una importante utilización de las drogas con alcaloides. Aunque algunos solo se emplean en forma de preparaciones galénicas (belladona, estramonio, beleño), muchas constituyen materias primas para la extracción industrial de los alcaloides que contienen: morfina de la paja de adormidera o del opio, escopolamina de las *Duboisia*, ajmalicina de las raíces de *Catharanthus*, vincamina de la hoja de vinca, quinina de las cortezas de quina. Una parte de los alcaloides extraídos puede ser transformada; la mayoría de la codeína se obtiene por metilación de la morfina, la quinina se puede convertir quinidina, la serpentina en ajmalicina, la tabersonina en vincamina; los alcaloides tropánicos se pueden hacer cuaternarios, etc.<sup>32</sup>

### **2.2.5 Dosis letal media (DL50)**

Es una dosis única de una sustancia, estadísticamente derivada, que puede causar la muerte del 50 % de los animales cuando se administra por vía oral u otra vía. El valor DL50 se expresa en términos de peso de la sustancia de ensayo por unidad de peso del animal (mg/Kg)<sup>38</sup>.

#### **2.2.5.1 Test de Irwin**

Procedimiento observacional sistemático, utilizado para determinar el espectro de actividad de una sustancia, efectos adversos y neurotoxicidad de la misma. Actualmente es un procedimiento recomendado por la ICH, para la evaluación de la seguridad farmacológica<sup>39</sup>.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. Material botánico

Se encuentra conformado por los tallos, hojas e inflorescencias de la especie *Dalea isidori* Barneby “Yerbechil”. (**Anexo I**)

##### 3.1.2. Material biológico

- Ratas hembras de la cepa Holtzman de 5 semanas de edad, de 70-150g de peso, las cuales fueron adquiridas del bioterio de la Universidad Nacional Agraria La Molina. (**Anexo II**)
- Ratones hembras de la cepa Balb/c de 5 semanas de edad, de 20-25g de peso, los cuales fueron adquiridos en la Universidad Particular Cayetano Heredia. (**Anexo III**)
- Ambas especies fueron sometidas a un proceso de aclimatación por un periodo de 7 días antes de realizar la prueba, a una temperatura controlada de  $20 \pm 2$  °C, con un ciclo de luz/oscuridad de 12-12 h y humedad de 30 a 65 %.
- La alimentación consistió en alimento para roedores y agua ad libitum.

##### 3.1.3. Materiales de laboratorio

Los materiales de laboratorio incluyeron: mortero y pilón; vasos de precipitación de 50 mL, 100 mL y 150 mL; fioles de 10 mL, 25 mL, 50 mL; pipetas de 1 mL, 5 mL y 10 mL; baguetas; frascos para muestras biológicas; frascos de vidrio color ámbar de 100 mL; cuba para cromatografía capa fina, sonda intragástrica, jeringas descartables de 1 mL y de 5 mL, agujas descartables N° 21G y N° 26G.



### **3.1.4. Equipos**

Los equipos empleados incluyeron: balanza analítica Biolab ® JF2004, estufa Memert® UN30, estufa Memert® UF60, molino manual CORONA®, pletismómetro digital PANLAB LE7500, Medidor Tail-Flick PANLAB LE7106, baño maría PEMALOR y kit de disección.

### **3.1.5. Reactivos**

Reactivo tricloruro férrico, reactivo agua de bromo, reactivo de gelatina, reactivo de ninhidrina, reactivo de Keller-Kelliani, reactivo de Borntrager, reactivo de Liebermann-Burchard, reactivo de Shinoda, reactivo de Dragendorff, reactivo de Mayer, reactivo Bertrand, reactivo de Bouchardart, reactivo de Rosenheim, ácido clorhídrico (HCl) al 1%, cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), etanol ( $\text{EtOH}$ ), metanol ( $\text{MeOH}$ ), n-butanol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ), acetato de etilo ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), ácido acético ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ), benceno ( $\text{C}_6\text{H}_6$ ), acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ), n-hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) y éter de petróleo, agua destilada, revelador de Dragendorff, revelador de tricloruro de hierro, amoniaco, clorometano ( $\text{CH}_3\text{Cl}$ ), silicagel 60 F.

## **3.2 METODOLOGÍA**

El estudio realizado fue de tipo experimental prospectivo.

### **3.2.1. Recolección de la planta**

Los tallos, hojas e inflorescencias de la especie *Dalea isidori* Barneby, fueron recolectados en su hábitat natural, entre los caseríos de La Colpa y Paucamayo del distrito de Ichocán, provincia de San Marcos, departamento de Cajamarca (a 2596 m s.n.m.), en el mes de septiembre del 2016.

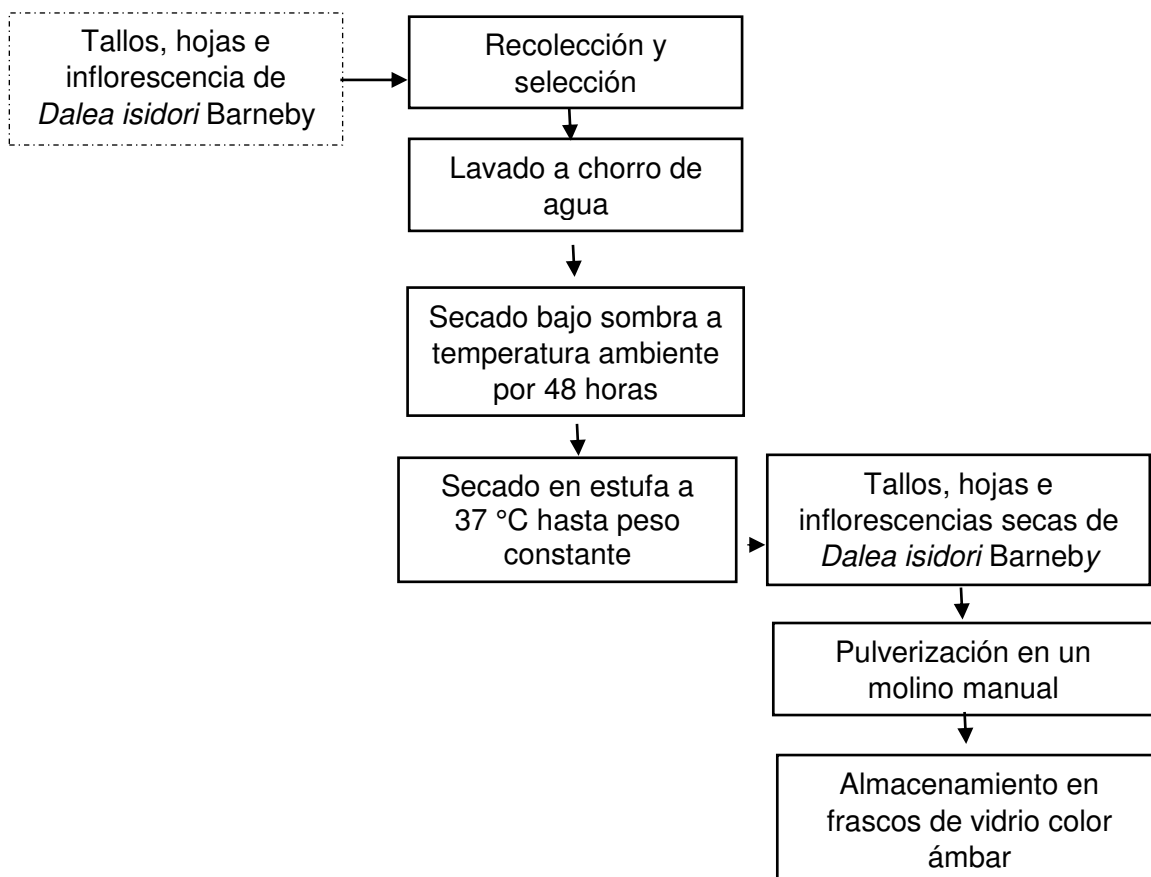
### **3.2.2. Selección y lavado**

Se seleccionaron tallos, hojas e inflorescencias intactas, en buen estado, libres de deterioro y/o hongos.

Los tallos, hojas e inflorescencias de *Dalea isidori* Barneby fueron lavados a chorros de agua.

### **3.2.3. Secado y pulverización**

Luego fueron secados a temperatura ambiente por un periodo de 48 horas. Terminado este periodo, se acondicionó el material botánico en sobres de papel kraft para someter a secado en estufa de lecho estático a 37 ° C hasta peso constante, luego se procedió a pulverizarla en un molino manual de discos (CORONA®), se pesó la cantidad de muestra pulverizada obtenida.



**Figura 16.** Esquema del tratamiento de la planta.

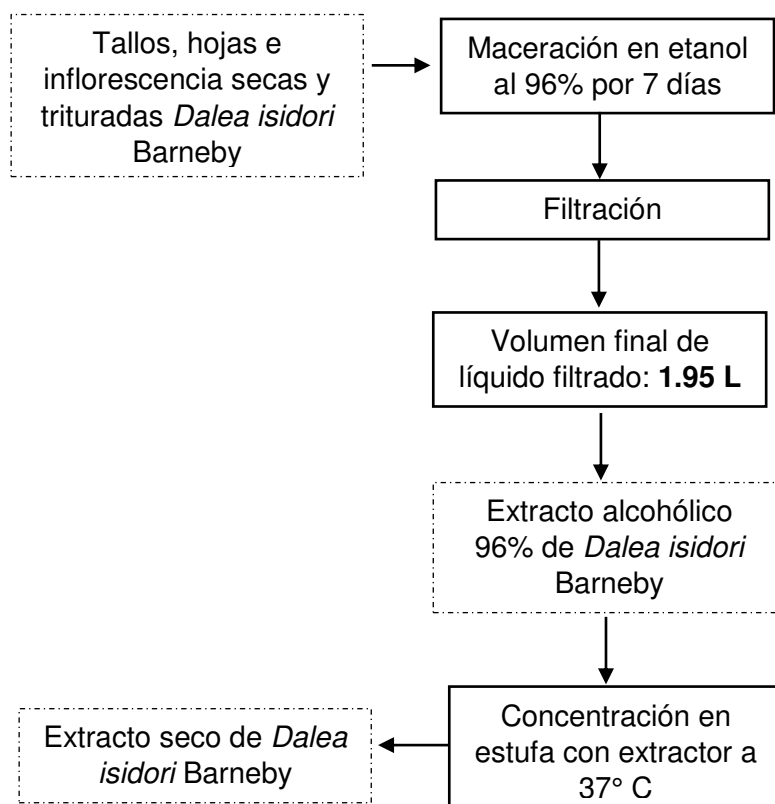
#### 3.2.4. Maceración

Se pesó 0,5 Kg de la planta desecada y pulverizada, y se distribuyó en cantidades iguales en cuatro frascos ámbar de capacidad de 4 L. A cada frasco se adicionó 2 L de etanol al 96%, de este modo cada muestra quedó cubierta aproximadamente por encima unos 5 cm. Se maceró con agitación intermitente cada 24 horas para una mejor extracción. Este proceso duró un periodo de 7 días.

#### 3.2.5. Filtración

Se procedió a realizar la filtración del macerado. Posteriormente se depositó el volumen obtenido en placas para evaporar etanol en estufa con extractor a una

temperatura de 37 °C, posteriormente el extracto seco se procedió a colocarlo en envases pequeños color ámbar.



**Figura 17.** Esquema de la obtención del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby.

### 3.2.6. Prueba de solubilidad

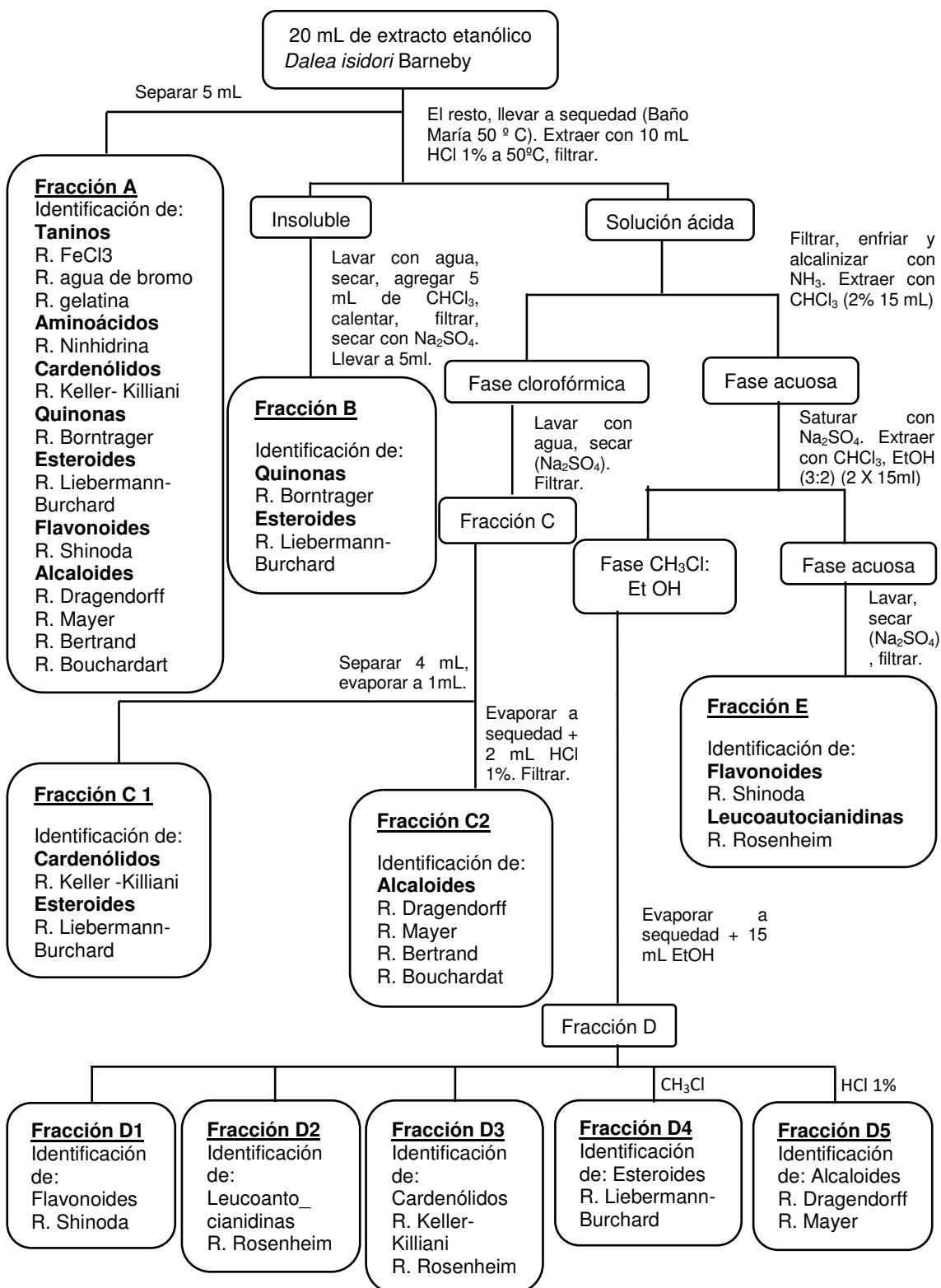
**Muestra problema:** extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.

**Procedimiento:** se colocó en once tubos de ensayo 0.1 g de extracto seco de *Dalea isidori* Barneby y se adicionó 5 mL de cada solvente. Se agitó por 3 minutos.

**Solventes empleados:** agua, etanol, metanol, n-butanol, acetato de etilo, cloroformo, ácido acético, benceno, acetona, n-hexano y éter de petróleo<sup>10</sup>.

### 3.2.7. Marcha fitoquímica<sup>30</sup>

**Ambiente de trabajo:** Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Universidad Nacional Mayor de San Marcos.



**Figura 18.** Esquema marcha fitoquímica.

**Fuente:** Lock O.<sup>30</sup>

### 3.2.8. Análisis cromatográfico

**Ambiente de trabajo:** laboratorio de CENPROFARMA (CCA) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### 3.2.8.1. Análisis cromatográfico de flavonoides

**Muestra:** Extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby

**Preparación de la muestra:** Se pesó 0.5 g del extracto etanólico seco de *Dalea isidori* Barneby y se reconstituyó en 10 mL de etanol 96 % v/v.

**Método:** Cromatografía en capa fina<sup>40</sup>:

- a.- Sistema de solventes: butanol - ácido acético – agua (4:1:5)
- b.- Soporte: silicagel 60 F
- c.- Revelador: Reactivo de tricloruro de hierro, vapores de amoníaco, Lámpara de luz UV.

#### 3.2.8.2. Análisis cromatográfico de alcaloides

**Muestra:** Extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby

**Preparación de la muestra:** Se pesó 0.5 g del extracto etanólico seco de *Dalea isidori* Barneby y se reconstituyó en 10 mL de etanol 96 % v/v.

**Método:** Cromatografía en capa fina<sup>40</sup>:

- a.- Sistema de solventes: cloroformo -metanol-amoniaco (10:1:1) v/v
- b.- Soporte: silicagel 60F
- c.- Revelador: Dragendorff.

### **3.2.9. Cuantificación de alcaloides totales del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby**

**Ambiente de trabajo:** laboratorio de CENPROFARMA (CCA) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

**Método:** Volumetría (Técnica Analítica TA/CCA-FQ009)<sup>30</sup>.

**Muestra problema:** Extracto etanólico *Dalea isidori* Barneby.

#### **Procedimiento:**

##### ***i. Desengrasado de la muestra:***

Se pesó dos gramos del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby y se empaquetó en papel filtro.

La muestra fue colocada en el Soxhlet y se enrasó con éter de petróleo hasta cubrir el filtro y se dejó que refluya al balón.

Luego, se conectó al refrigerante y se dejó extraer las grasas por tres horas.

Una vez concluido el tiempo estimado, se apagó la hornilla y dejó correr agua media hora más.

Se trabajó con la muestra del filtro.

##### ***ii. Extracción de alcaloides:***

Se pesó un gramo de la muestra del papel filtro y se agregó 15 mL de HCl 1 N y se llevó a baño maría a 60°C por 30 minutos. Se agitó constantemente, enfrió y dejó filtrar.

Se transvasó el filtrado a pera de decantación y se agregó éter etílico (30 mL).

Se separó la parte acuosa (alcaloide en forma de sal) y se alcalinizó con NaOH hasta pH=12.

Posteriormente, se transvasó la parte acuosa a una pera de decantación, y se agregó 45 mL de diclorometano para extraer los alcaloides en forma básica.

Se separó la parte orgánica en un matraz para realizar la titulación.

**iii. Titulación de alcaloides:**

Se colocó la parte orgánica en un matraz y se agregó 10 mL de ácido acético glacial, 5 mL ácido fórmico y tres gotas de cristal violeta.

Se valoró con ácido perclórico 0.01N hasta el punto final que es el cambio de coloración de azul a verde.

El cálculo de % de alcaloides se realizó de la siguiente manera:

$$[\text{Alcaloides}] \% = \text{gasto} \times Fc \times N \times Pm \times 100 / \text{Peso muestra} \times 1000$$

Pm: peso molecular del alcaloide de mayor proporción en la muestra.

**3.2.10. Determinación del efecto antiinflamatorio del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby**

**Ambiente de trabajo:** Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

**Método:** edema plantar inducido por carragenina<sup>41,42</sup> descrito por primera vez por Winter y Porter, 1957 y posteriormente modificado por Sugishita et al.

**Fundamento del método:** Se basa en la inducción de la inflamación por inyección subplantar (pata posterior izquierda de la rata) de una suspensión de  $\lambda$  carragenina al 1% (0.1 mL), cuyo principal signo es la formación de edema, el cual es medido con el pletismómetro digital PANLAB LE7500.

**Muestra problema:** Extracto etanólico *Dalea isidori* Barneby.

**Patrones:** Ácido acetilsalicílico (AAS) y Naproxeno sódico.

**Animales de experimentación:** 36 ratas albinas, hembras, de la cepa Holtzman, procedentes del bioterio de la Universidad Nacional Agraria La Molina, con 5 semanas de edad y un peso promedio entre 70 a 150 g. Aclimatadas por un periodo de siete días, antes de realizar la prueba; a



temperatura controlada de  $20 \pm 2$  °C; con un ciclo de luz/oscuridad de 12-12 h y humedad relativa de 30 a 65 %.

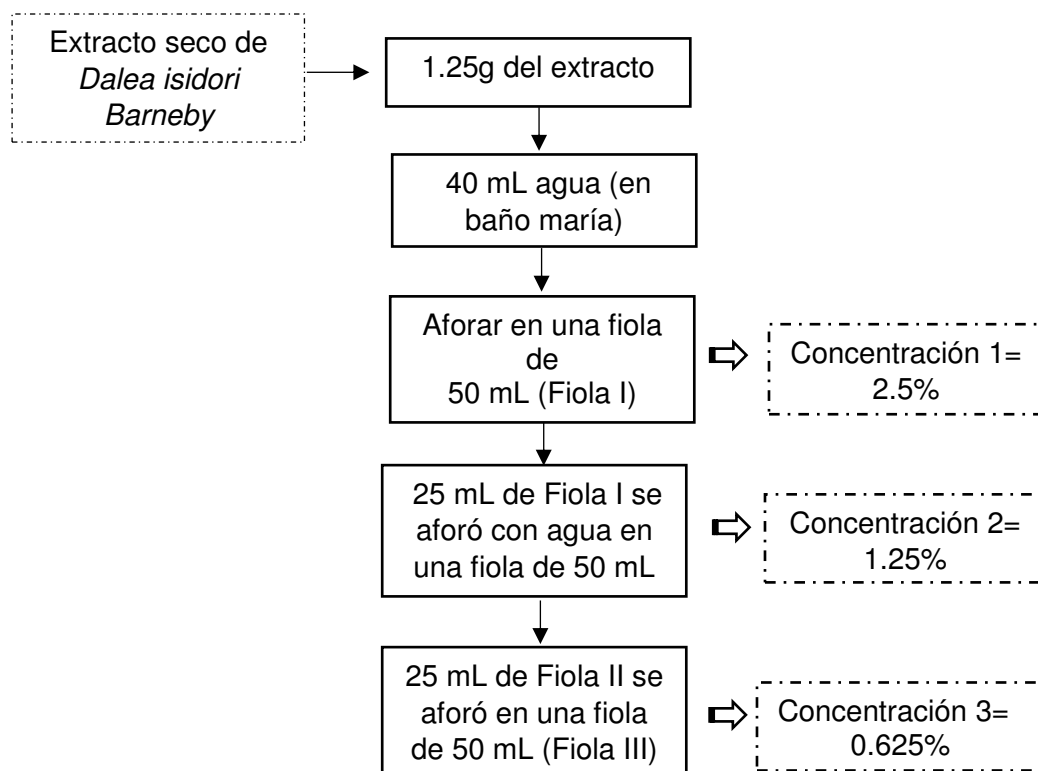
Divididas de forma aleatoria en seis grupos: G1, G2, G3, G4, G5, G6.

Donde a cada grupo se le administró:

**Tabla 6.** Concentraciones de las sustancias administradas a cada grupo de trabajo para la evaluación del efecto antiinflamatorio.

GRUPO	CONCENTRACIONES ADMINISTRADAS
G1	Control (suero fisiológico)
G2	Extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby al 0.625% (125 mg/Kg)
G3	Extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby al 1.25% (250 mg/Kg)
G4	Extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby al 2.5% (500 mg/Kg)
G5	Patrón al 0.25% (AAS 50 mg/ Kg)
G6	Patrón al 0.5% (naproxeno sódico 50 mg/ Kg)

**Preparación de las muestras problema:** Se pesó en un vaso de precipitación 1.25 g del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby, se colocó a baño maría y se agregó 40 mL de agua , se agitó constantemente hasta que se formó una suspensión homogénea, luego se llevó a una fiola de 50 mL y se aforó con agua [concentración 1]; se tomó un 25 mL de la [1] y se llevó a una fiola de 50 mL aforando con agua [concentración 2]; Se tomó 25 mL de la [2] y se llevó a una fiola de 50 mL y se aforo con agua [concentración 3].



**Figura 19.** Esquema de preparación de las concentraciones del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby para la determinación del efecto antiinflamatorio.

#### **Preparación de los patrones:**

**a.-Ácido acetilsalicílico:** se trabajó con tabletas de 500 mg de ácido acetilsalicílico (ASPIRINA FORTE®).

Se pesó una tableta entera de ASPIRINA FORTE®, luego se trituro con la ayuda de un mortero, se tomó un peso equivalente a 62.5 mg de AAS y se suspendió en 20 ml de agua y se llevó a una fiola de 25 mL aforando con agua.

**b.-Naproxeno sódico:** se trabajó con tabletas de 550 mg de naproxeno sódico (APRONAX® 550)

Se pesó una tableta entera APRONAX® 550, luego se trituro con la ayuda de un mortero, luego se tomó un peso equivalente a 125 mg de naproxeno, se suspendió en 20 ml de agua y se llevó a una fiola de 25 mL aforando con agua.

### Procedimiento:

- a.- Medición del estado basal de la pata posterior izquierda de la rata.
- b.- Administración de  $\lambda$  carragenina al 1% (0.1mL) suspendido en NaCl 0.9%, en la pata posterior izquierda de cada una de las ratas.
- c.- Administración intragástrica a cada grupo según lo descrito a continuación:

**Tabla 7.** Volúmenes administrados a cada grupo de trabajo para la evaluación del efecto antiinflamatorio.

GRUPO	CONCENTRACIONES ADMINISTRADAS
G1	Control: 2 mL de suero fisiológico
G2	Entre 1.58 mL a 2.62 mL del extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby al 2.5%
G3	Entre 1.76 mL a 2.88 mL del extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby al 1.25%
G4	Entre 1.84 mL a 2.80 mL del extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby al 0.625%
G5	Entre 1.96 mL a 3.00 mL de la suspensión de AAS al 0.25%
G6	Entre 1.82 mL a 2.80 mL de la suspensión de naproxeno sódico al 0.5%

- d.- Medición del volumen de la pata en el pletismómetro digital PANLAB LE7500 a las: 0.5, 1, 2, 3 y 5 horas.
- e.- Medición de la eficacia antiinflamatoria, la cual se define como la acción que contrasta la inflamación producida por la  $\lambda$  carragenina, matemáticamente se expresa de la siguiente forma<sup>43</sup>:

$$X = [ (\Delta B/B_0 - \Delta V/V_0) / \Delta B/B_0 ] \times 100$$

Donde:

$\Delta B/B_0$ : Es el incremento del volumen del control debido a la inflamación, referido al volumen inicial  $B_0$  del mismo.

$\Delta V/V_0$ : es el incremento de volumen inflamado, pero tratado con un agente antiinflamatorio.

f.- Análisis estadístico: Se determinó la significación estadística entre los grupos tratados con el extracto, con los patrones y el grupo control con el análisis de varianza (ANOVA) y también se realizó el test de TUKEY para la comparación de a dos entre ellos. Se utilizó el programa SPSS 23.

Se planteó lo siguiente<sup>44</sup>:

$$H_0: Y_1 = Y_2 = Y_3 = Y_4 = Y_5 = Y_6$$

$$H_A: Y_1 \neq Y_2 = Y_3 = Y_4 = Y_5 = Y_6 \text{ (por lo menos uno es diferente).}$$

Donde:

Y: media de la variación de volumen para cada grupo.

Del análisis de ANOVA:

Sí  $p < 0.05$ , se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis

Sí  $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula.

### **3.2.11. Determinación del efecto analgésico del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.**

**Ambiente de trabajo:** Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

**Método:** prueba de retirada de la cola (Tail-Flick Test)<sup>45,46</sup>.

**Fundamento del método:** Se fundamenta en la analgesia térmica descrita por D' Amour y Smith. El test consiste en colocar la cola del ratón frente a una luz infrarroja de intensidad constante que aumenta la temperatura de la piel del

animal hasta alcanzar un nivel que produce dolor, momento en el cual el animal retira la cola por acto reflejo<sup>45,46</sup>.

**Muestra problema:** Extracto etanólico *Dalea isidori* Barneby.

**Patrones:** Tramadol<sup>47</sup> y Paracetamol<sup>11</sup>

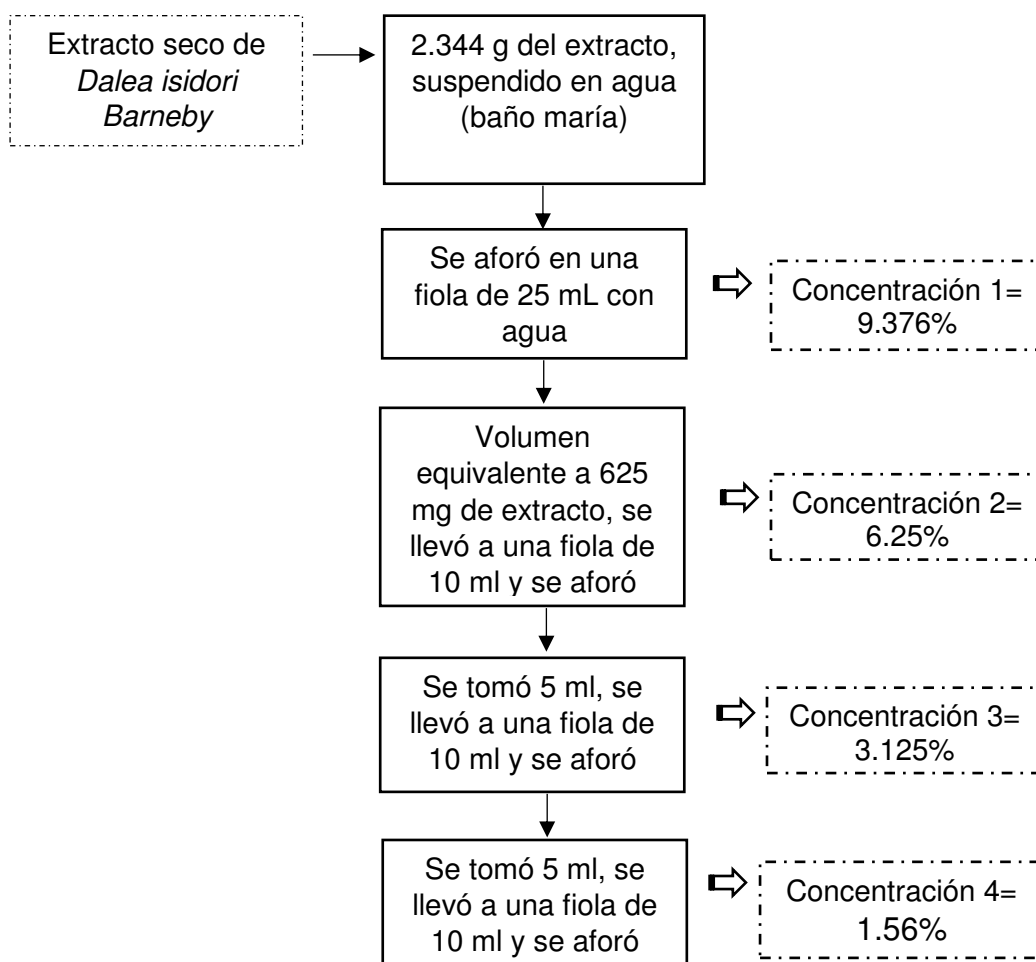
**Animales de experimentación:** 36 ratones, hembras, albinas de la cepa Balb/c, procedentes del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), con 5 semanas de edad y un peso promedio entre 20 a 30 g. Aclimatadas por un periodo de siete días, antes de realizar la prueba; a temperatura controlada de  $20 \pm 2$  °C; con un ciclo de luz/oscuridad de 12-12 h y humedad relativa de 30 a 65 %. Divididas de forma aleatoria en seis grupos: G1, G2, G3, G4, G5, G6. Donde a cada grupo se le administró:

**Tabla 8.** Concentraciones de las sustancias administradas a cada grupo de trabajo para la evaluación del efecto analgésico.

GRUPO	CONCENTRACIONES ADMINISTRADAS
G1	Tramadol al 0.25% (20 mg/ Kg)
G2	Paracetamol al 5% (400 mg/Kg)
G3	Extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby 1.56% (125 mg/Kg)
G4	Extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby al 3.125% (250 mg/Kg)
G5	Extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby al 6.25% (500 mg/Kg)
G6	Extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby al 9.376% (750 mg/Kg)

Para esta prueba no es necesario un grupo blanco, ya que cada animal es su propio control.

**Preparación de las muestras problema:** Se pesó en un vaso de precipitación 2.34 g del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby, se colocó en baño maría y se agregó 20 mL de agua. Se agitó constantemente hasta que se formó una suspensión homogénea, luego se llevó a una fiola de 25 mL y se aforó con agua [concentración 1]; se tomó un volumen equivalente a 625 mg de la [1] y se llevó a una fiola de 10 ml aforándolo con agua [concentración 2]; Se tomó 5 ml de la [2] y se llevó a una fiola de 10 mL aforándolo con agua [concentración 3]; se tomó 5 mL de la [3] y se llevó a una fiola de 10 mL aforándolo con agua [concentración 4].



**Figura 20.** Esquema de la preparación de las concentraciones del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby para determinar el efecto analgésico.

### Preparación de los patrones:

**a.-Tramadol:** se trabajó con tramadol genérico del Laboratorio Genfar ampollas de 50 mg/mL.

Se tomó un volumen equivalente a 25 mg de tramadol y se llevó a una fiola de 10 ml aforando con agua.

**b.-Paracetamol:** se trabajó con paracetamol genérico de Laboratorio Genfar, tabletas de 500 mg.

Se trituró una tableta, se suspendió toda la tableta en un vaso de precipitación con agua, luego se llevó a una fiola de 10 mL aforando hasta volumen con agua.

### Procedimiento:

- a.- Medición del tiempo de reacción al dolor basal a cada animal con el medidor Tail-Flick PANLAB LE7106.
- b.- Administración oral de la dosis correspondiente de patrones y de extracto a cada grupo expresado en volumen según:

**Tabla 9.** Volúmenes administrados a cada grupo de trabajo para la evaluación del efecto analgésico.

GRUPO	CANTIDADES ADMINISTRADAS
G1	Entre 0.18 mL a 0.22 mL de la solución de tramadol al 0.25%.
G2	Entre 0.19 ml a 0.24 mL de la suspensión de paracetamol al 5%.
G3	Entre 0.17 mL a 0.22 mL del extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby al 1.56%
G4	Entre 0.21 mL a 0.22 mL del extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby al 3.125%
G5	Entre 0.20 mL a 0.22 mL del extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby al 6.25%
G6	Entre 0.19 mL a 0.24 mL del extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby al 9.376%

c.- Se midió el tiempo de reacción al dolor a los 30, 60 y 90 minutos, después de administrados los tratamientos, con el medidor Tail-Flick PANLAB LE7106.

d.- El efecto analgésico se establece como el porcentaje del incremento del tiempo de reacción al dolor (% In.TRD) según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ In.TRD} = [ (XTRD_t - XTRD_0) / XTRD_0 ] \times$$

Donde:

XTRD: Promedio del tiempo de reacción al dolor.

XTRD<sub>t</sub>: Promedio del tiempo de reacción al dolor a los diferentes tiempos experimentales (30, 60 y 90 minutos).

XTRD<sub>0</sub>: Promedio del tiempo de reacción al dolor basal.

f.- Análisis estadístico: Se determina la significación estadística entre los grupos tratados con el extracto, con los patrones y el grupo control con el análisis de varianza (ANOVA) y también se realizó el test de TUKEY para la comparación de a dos entre ellos. Se utilizó el programa SPSS 22.

Se plantea lo siguiente<sup>44</sup>:

$$H_0: Y_1 = Y_2 = Y_3 = Y_4 = Y_5 = Y_6$$

$$H_A: Y_1 \neq Y_2 = Y_3 = Y_4 = Y_5 = Y_6 \text{ (por lo menos uno es diferente).}$$

X: medias.

Del análisis de ANOVA:

Sí  $p < 0.05$ , se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

Sí  $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula.



### 3.2.12. Determinación del DL50 oral

**Ambiente de trabajo:** Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

**Método:** OECD 23 Guía para ensayos químicos<sup>38</sup>. (**Anexo X**)

**Fundamento del método:** El test consistió en determinar el porcentaje de mortalidad del extracto a través de una concentración fija (2000 mg/Kg), la cual fue administrada de forma intragástrica, con lo que se determinó si dicha dosis generaba la muerte del 50% de los animales tratados.

**Muestra problema:** Extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.

#### **Procedimiento<sup>38</sup>:**

Para la determinación de la toxicidad aguda del extracto se emplearon 6 ratones albinos hembras de la cepa Balb /c de 21-30 g de peso. Divididos en dos grupos de 3.

Se realizó la aclimatación de los animales seleccionados a temperatura controlada de  $20 \pm 2$  °C con un ciclo de luz/oscuridad de 12-12 h, humedad de 30 a 65 %. La alimentación consistió en alimento pelletizado para ratones y agua *ad libitum* hasta unas 12 horas antes de la prueba.

Se trabajó con el primer grupo de 3 ratones según lo establecido en la OECD.

Se realizó control inicial de los pesos de los animales.

Los animales en ayuno, recibieron una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal. Luego de administrado el extracto, los animales continuaron retirados de alimentos durante 4 horas.

Se evaluaron los signos de los animales cada 30 minutos durante las primeras 4 horas luego de administrado el extracto. Luego, se realizó una observación

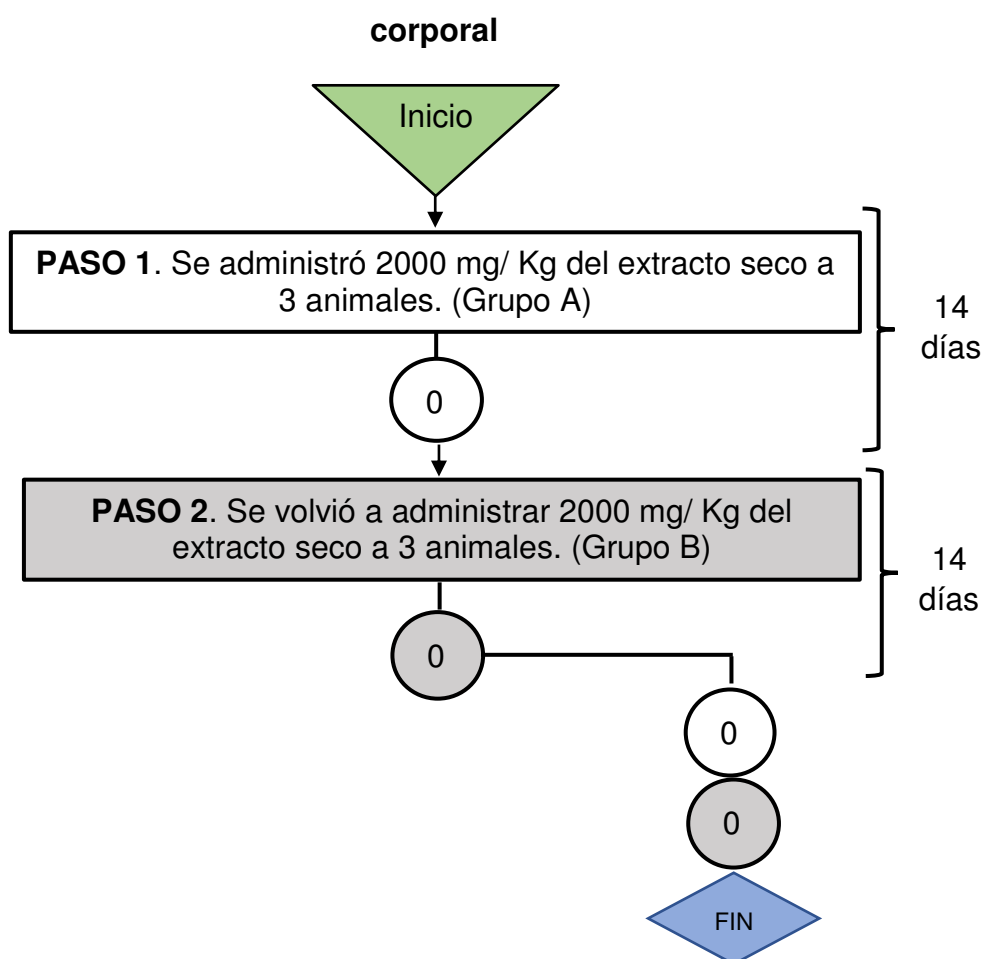
constante hasta completar las 24 horas de administrado el extracto. La prueba tuvo una duración total de 28 días, 14 días por cada grupo.

Los signos observados fueron anotados en el test de Erwin (**Anexo IX**):

Se realizó un control final de los pesos de los animales en el día 14.

Finalizada la prueba se sacrificó a los animales (por tracción de la nuca) para la realización de la necropsia, la cual consistió en una evaluación macroscópica y microscópica de los principales órganos como corazón, riñón, pulmón e hígado en cada uno de los grupos. Dicha evaluación fue realizada en el Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria de la Universidad Científica del Sur.

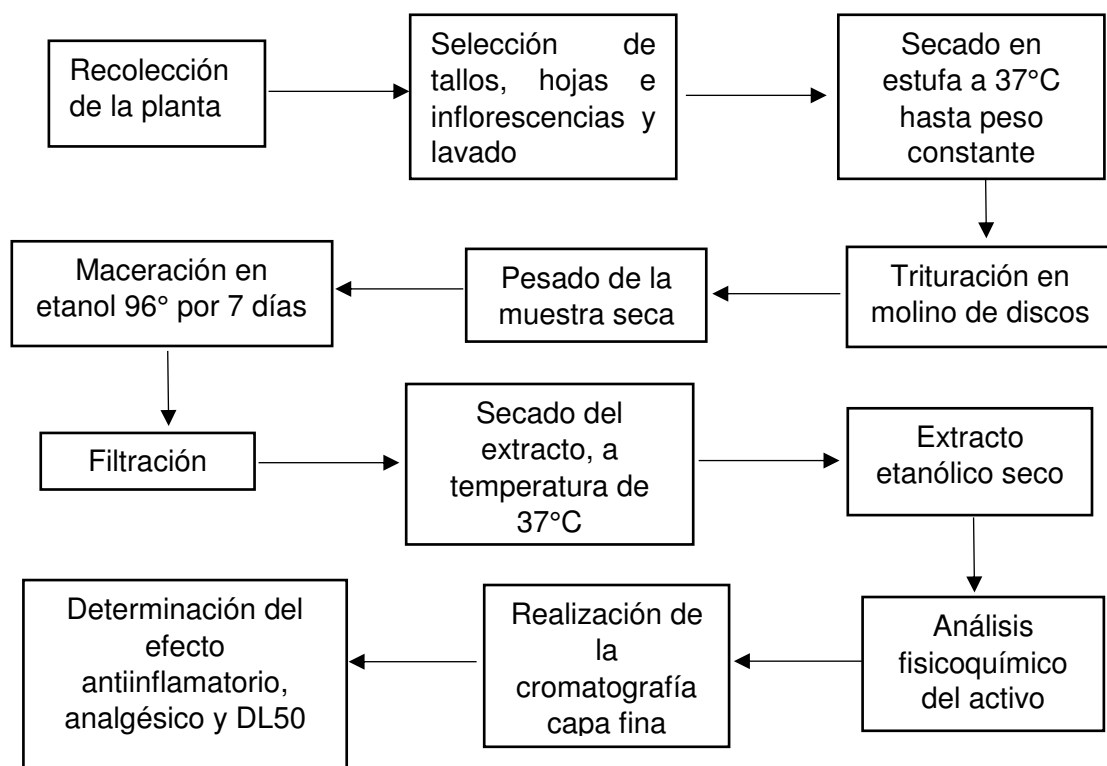
#### **Procedimiento de ensayo con una dosis inicial de 2000 mg/ Kg por peso**



**Figura 21.-** Esquema del procedimiento para la determinación del DL50 oral.

○, ○ : Número de moribundos o animales muertos en cada paso.

**Fuente:** OECD 23<sup>38</sup>



**Figura 22.** Esquema de las principales etapas de desarrollo de trabajo.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Análisis Fisicoquímico del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby

**Tabla 10.** Prueba de solubilidad.

Solventes	
Etanol	Muy soluble
Metanol	Muy soluble
Cloroformo	Poco soluble
n-butanol	Poco soluble
n-hexano	Poco soluble
Acetato de etilo	Poco soluble
Benceno	Poco soluble
Ácido acético	Poco soluble
Agua destilada	Poco soluble
Acetona	Insoluble
Éter de petróleo	Insoluble

De los resultados obtenidos el extracto presenta mayor solubilidad en solventes polares. (**Anexo IV**)

**Tabla 11.** Marcha fitoquímica.

Fracción A			
Metabolitos	Reactivo	Resultado	Calificación
Taninos	R. FeCl <sub>3</sub>	Precipitado verde oscuro	++++
Taninos	R. gelatina	Precipitado blanco	+++
Aminoácidos	R. Ninhidrina	Coloración vino tinto	+
Cardenólidos	R. Keller – Killiani	Anillo pardo	++
Quinonas	R. Borntrager	Precipitado anaranjado	++
Esteroides	R. Liebermann - Burchard	Coloración verde azulada	+++
Flavonoides	R. Shinoda	Coloración rosa	+++
Alcaloides	R. Dragendorff	Precipitado rojizo	+++
Alcaloides	R. Mayer	Precipitado blanco	+
Alcaloides	R. Bertrand	Precipitado marrón	+
Alcaloides	Bouchardat	Precipitado verde	++

En esta tabla, se describe los resultados de la marcha fitoquímica, donde las fracciones A, B, C y D, se corresponden según la metodología de Lock O<sup>30</sup>.

**Tabla 11.** Marcha fitoquímica. Continuación.

<b>Fracción B</b>			
<b>Metabolitos</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Resultado</b>	<b>Calificación</b>
Quinonas	R. Borntrager	Precipitado anaranjado	++
Esteroides	R. Liebermann-Burchard	Coloración verde azulada	++
<b>Fracción C</b>			
<b>Metabolitos</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Resultado</b>	<b>Calificación</b>
Cardenólidos	R. Keller-Killiani	Anillo rosa	++
Esteroides	R. Liebermann-Burchard	Coloración verde	++
Alcaloides	R. Dragendorff	Precipitado rojizo	++
Alcaloides	R. Mayer	Precipitado blanco	+
Alcaloides	R. Bertrand	No hay coloración	-
Alcaloides	Sommenscheich	Precipitado amarillo	+
<b>Fracción D</b>			
<b>Metabolitos</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Resultado</b>	<b>Calificación</b>
Flavonoides	R. Shinoda	No hay coloración	-
Leucoantocianidinas	R. Rosenheim	Coloración marrón	-
Cardenólidos	R. Keller- Killiani	Coloración amarilla	-
Esteroides	R. Liebermann-Burchard	Coloración rosa	-
Alcaloides	R. Dragendorff	Precipitado rojizo	++++
Alcaloides	R. Mayer	Precipitado blanco	++

En esta tabla, se describe los resultados de la marcha fitoquímica, donde las fracciones A, B, C y D, se corresponden según la metodología de Lock O<sup>30</sup>.

**(Anexo V)**

Presencia del metabolito:

(+): muy poco

(++): poco

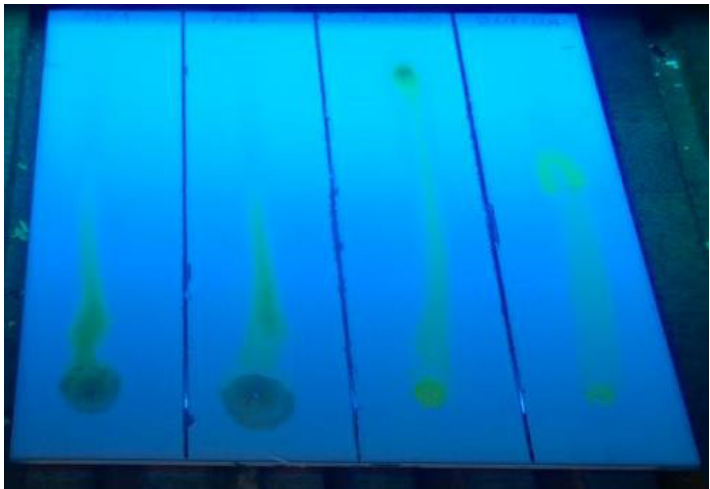
(+++): regular

(++++): bastante

Ausencia del metabolito:

(-)

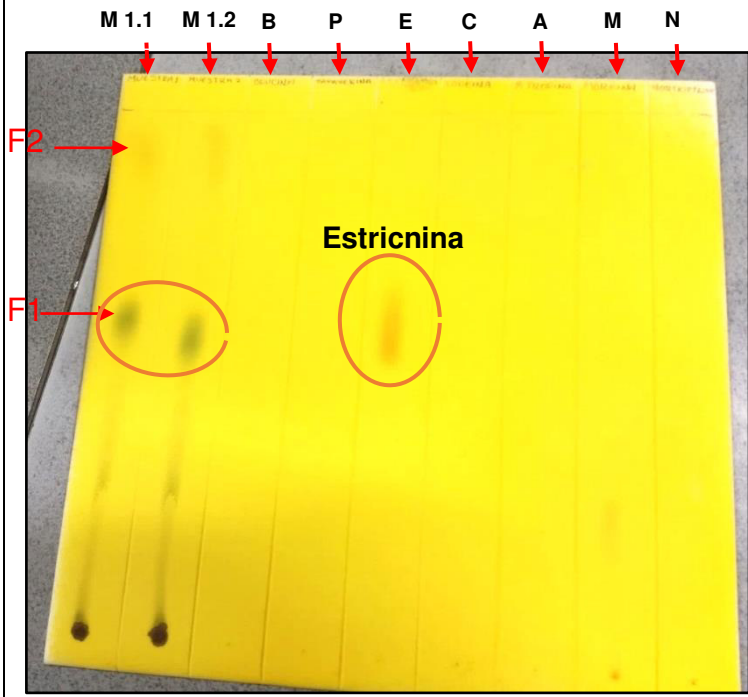
**Tabla 12.** Análisis cromatográfico de flavonoides.

Método	Cromatografía capa fina (CCF)
Sistemas de solventes	Butanol: ácido acético: agua (4:1:5)
Soporte	Silicagel 60 F
Revelador	Reactivo de tricloruro de hierro, vapores de amoniaco + luz UV
Rf (Extracto)	<p><b>Muestra 1.1 (M 1.1):</b>  Rf (Revelador tricloruro de hierro) = 0.30  Rf (Vapores de amoniaco + luz UV) = 0.30</p> <p><b>Muestra 1.2 (M 1.2):</b>  Rf (Revelador tricloruro de hierro) = 0.29  Rf (Vapores de amoniaco + luz UV) = 0.29</p>
Rf (Estándares)	<p><b>St. Rutina:</b>  Rf (Revelador tricloruro de hierro) = 0.576  Rf (Vapores de amoniaco + luz UV) = 0.576</p> <p><b>St. Quercetina:</b>  Rf (Revelador tricloruro de hierro) = 0.897  Rf (Vapores de amoniaco + luz UV) = 0.897</p> <div style="text-align: center;"> <p><b>M 1.1    M 1.2    Q    R</b></p> <p>↓       ↓       ↓       ↓</p>  </div> <p><b>M 1.1 y M 1.2:</b> Extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby.  <b>Q:</b> Quercetina    <b>R:</b> Rutina</p>

**Anexo VI** (Fotos 25 - 26), (**Anexo XII**)

Rf: factor de retención, St: estándar

**Tabla 13.** Análisis cromatográfico de alcaloides

Método	Cromatografía capa fina (CCF)
Sistemas de solventes	Cloroformo: metanol: amoníaco (10:1:1)
Soporte	Silicagel 60 F
Revelador	Reactivo de Dragendorff
Estándares	Brucina, papaverina, estricnina, codeína, atropina, morfina y nortriptilina
Rf (Extracto)	<p><b>Muestra 1.1 (M 1.1):</b>  F1: Rf (Revelador Dragendorff) = 0.562  F2: Rf (Revelador Dragendorff) = 0.8</p> <p><b>Muestra 1.2 (M 1.2):</b>  F1: Rf (Revelador Dragendorff) = 0.559  F2: Rf (Revelador Dragendorff) = 0.85</p>
Rf Estándares)	<p><b>St. Estricnina:</b> Rf (Revelador Dragendorff) = 0.56</p> <p><b>St. Morfina:</b> Rf (Revelador Dragendorff) = 0.24</p>  <p><b>M 1.1 y M 1.2:</b> Extracto de <i>Dalea isidori</i> Barneby.</p> <p><b>B:</b> Brucina <b>P:</b> Papaverina <b>E:</b> Estricnina  <b>C:</b> Codeína <b>A:</b> Atropina <b>M:</b> Morfina <b>N:</b> Nortriptilina</p>

**Anexo VI** (Fotos 22 - 24), (**Anexo XI**)

Rf: factor de retención, F1: fracción 1, F2: fracción 2, St: estándar

**Tabla 14.** Cuantificación de alcaloides totales del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby.

Prueba	Método	Resultado
% Alcaloides	Volumetría	0.95%

La cuantificación de alcaloides totales dio como resultado 0.95 g de alcaloides por cada 100g de extracto seco de *Dalea Isidori* Barneby. (**Anexo XIII**)

#### 4.2. Determinación del efecto antiinflamatorio en las diferentes dosis del extracto de *Dalea isidori* Barneby

**Tabla 15.** Valores promedio de la variación de volumen (mL) de los tratamientos en el tiempo.

T	Control	125 mg/Kg	250 mg/Kg	500 mg/Kg	AAS	Naproxeno
0'	0	0	0	0	0	0
30'	.7450	.7217	.4183	.7300	.2317	.3767
60'	.8317	.6133	.6083	.8200	.5167	.5400
120'	1.2050	1.1450	1.0750	1.2050	1.0083	1.0467
180'	.9217	.8850	.7883	.8683	.8033	.6350
300'	.8517	.8517	.8483	.8333	.7667	.7717

Para este caso se estableció que:

$H_0$ : los promedios de la variación de volumen (mL) de todos los grupos son iguales.

$H_A$ : por lo menos uno de los promedios de uno de los grupos es diferente.

Del análisis estadístico ANOVA (**Anexo XIV**), evidenciamos que a los tiempos 30', 60' y 180' los valores de variación de volumen presentan diferencia significativa, por lo tanto, para estos casos rechazamos la  $H_0$  y aceptamos la  $H_A$ ; por otro lado, a los 120' y 300' los valores no presentan diferencia significativa por lo que se asume que los valores de variación de volumen son iguales estadísticamente. Par los tiempos de 30', 60' y 180' se realizó el test de Tukey (comparaciones múltiples).



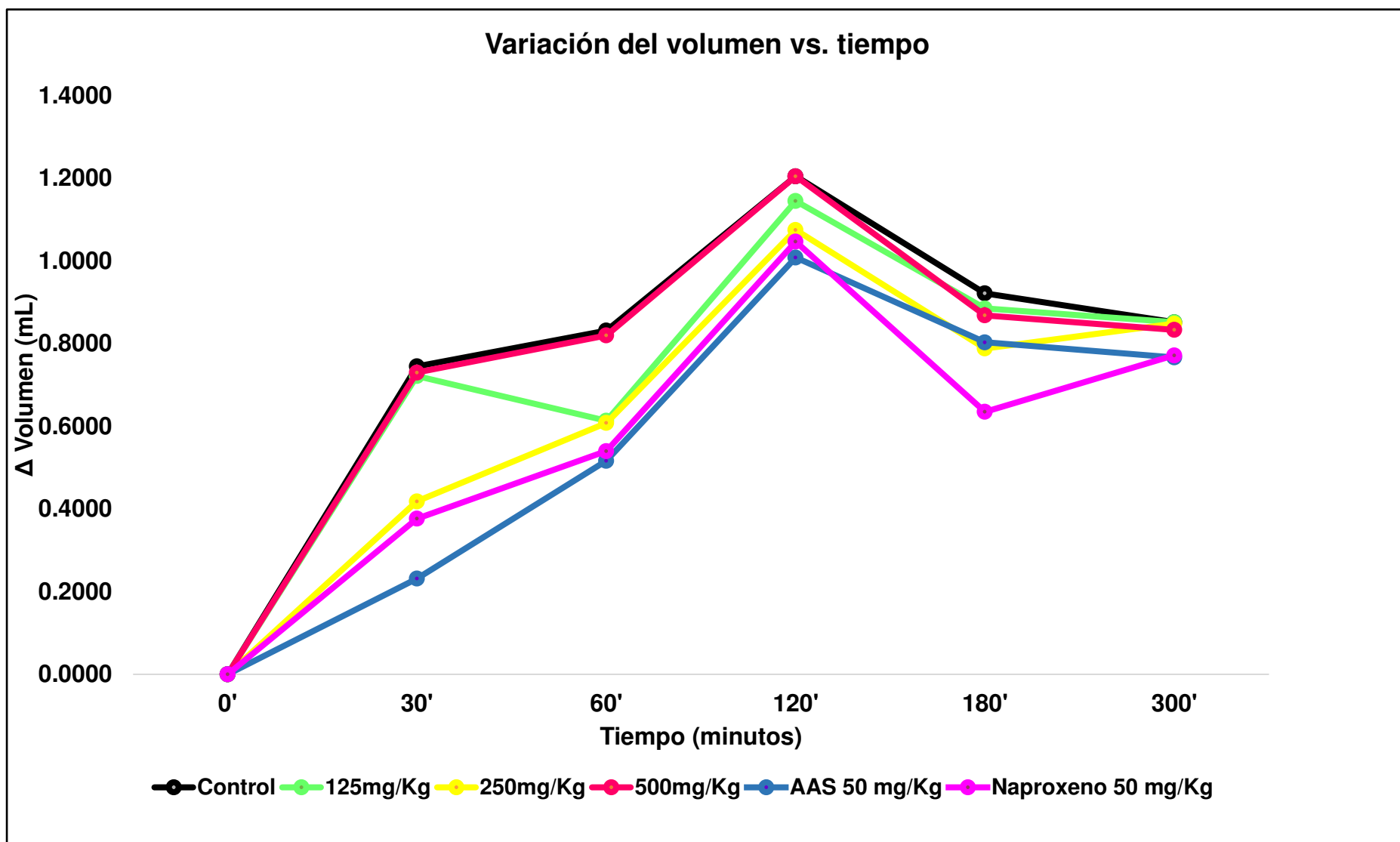
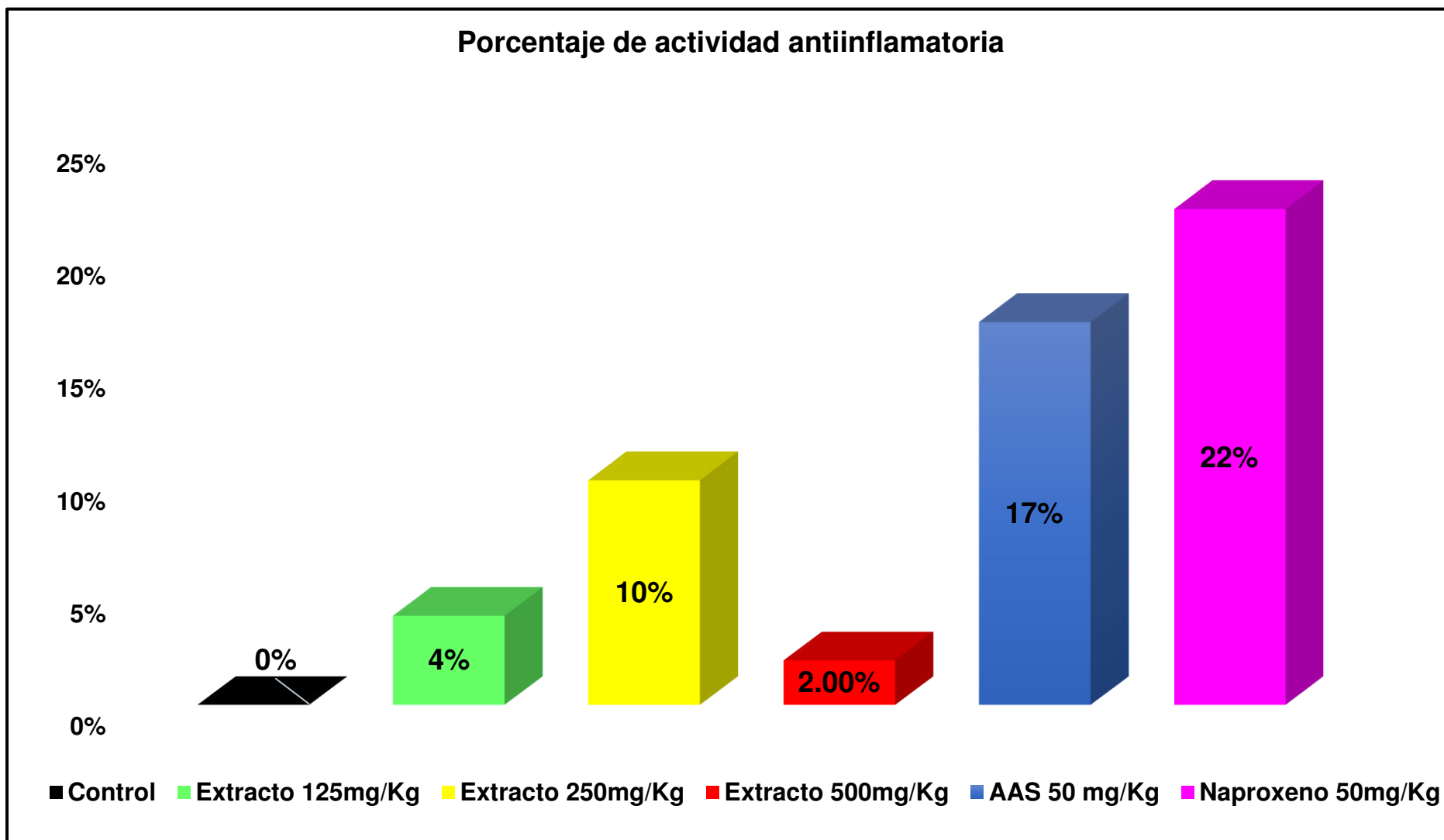


Figura 23. Variación del volumen en el tiempo de las dosis del extracto y patrones.

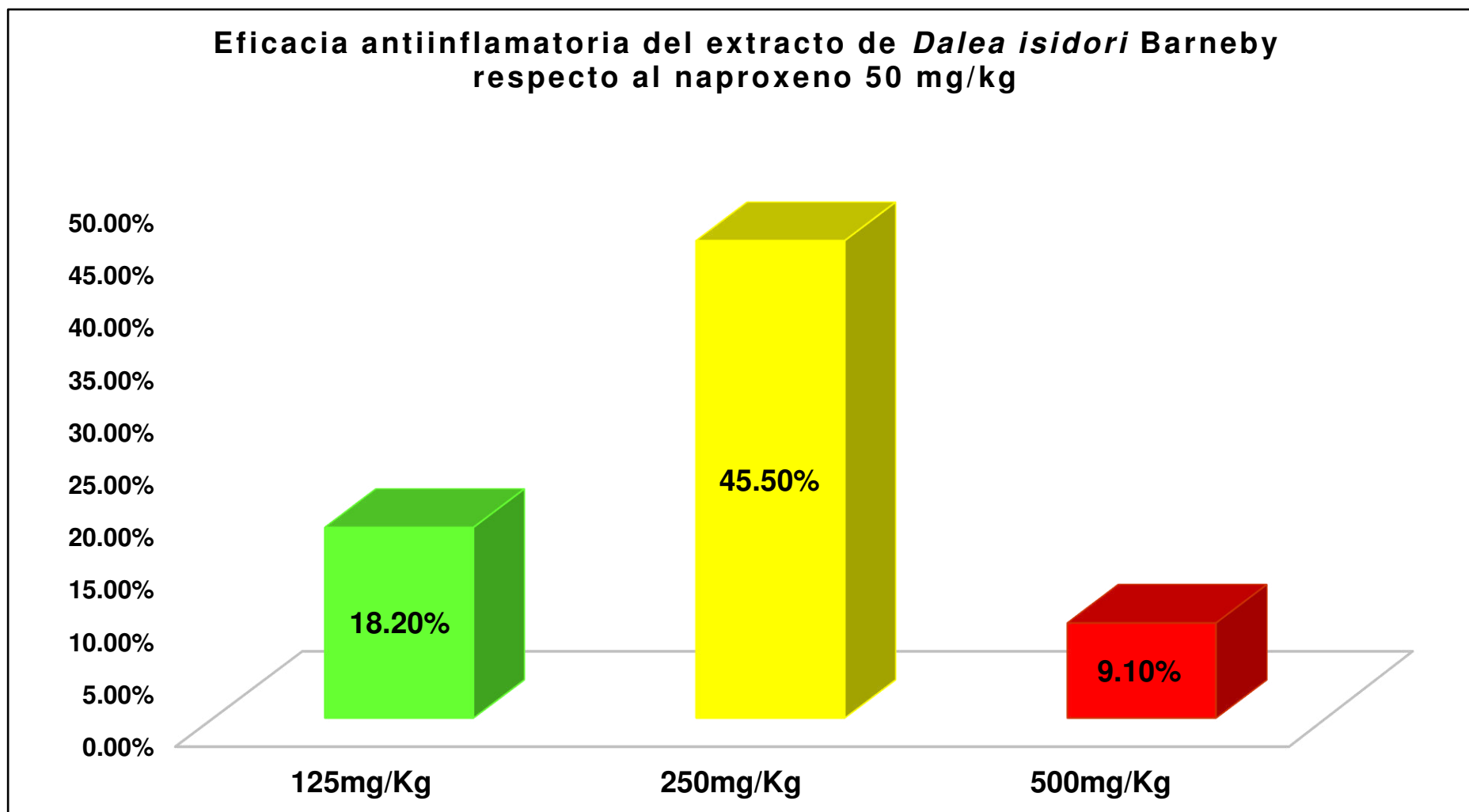
**Tabla 16.** Actividad antiinflamatoria para cada tratamiento en cada momento experimental.

<b>T</b>	<b>Control</b>	<b>125mg/Kg</b>	<b>250mg/Kg</b>	<b>500mg/Kg</b>	<b>AAS</b>	<b>Naproxeno</b>
<b>0'</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<b>30'</b>	0%	0%	37.76%	2.01%	65.11%	48.32%
<b>60'</b>	0%	21.11%	18.92%	1.40%	30.23%	33.63%
<b>120'</b>	0%	0%	1.11%	0%	6.12%	11.21%
<b>180'</b>	0%	0%	5.19%	5.79%	2.21%	29.57%
<b>300'</b>	0%	0%	0%	2.15%	0%	7.38%
<b>Promedio</b>	0%	4%	10%	2%	17%	22%

Se tabulan los resultados de la eficacia antinflamatoria según la fórmula descrita en la metodología; los resultados reflejan que de las tres dosis del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby que se ensayaron, la que presenta una mayor eficacia antinflamatoria es la de 250 mg/Kg, puesto que su efecto se mantiene en el tiempo, aunque con una tendencia a la baja. Las otras dosis ensayadas presentan datos muy variables con lo cual no se puede establecer una tendencia, estos resultados se pueden visualizar en la **Figura 24**.

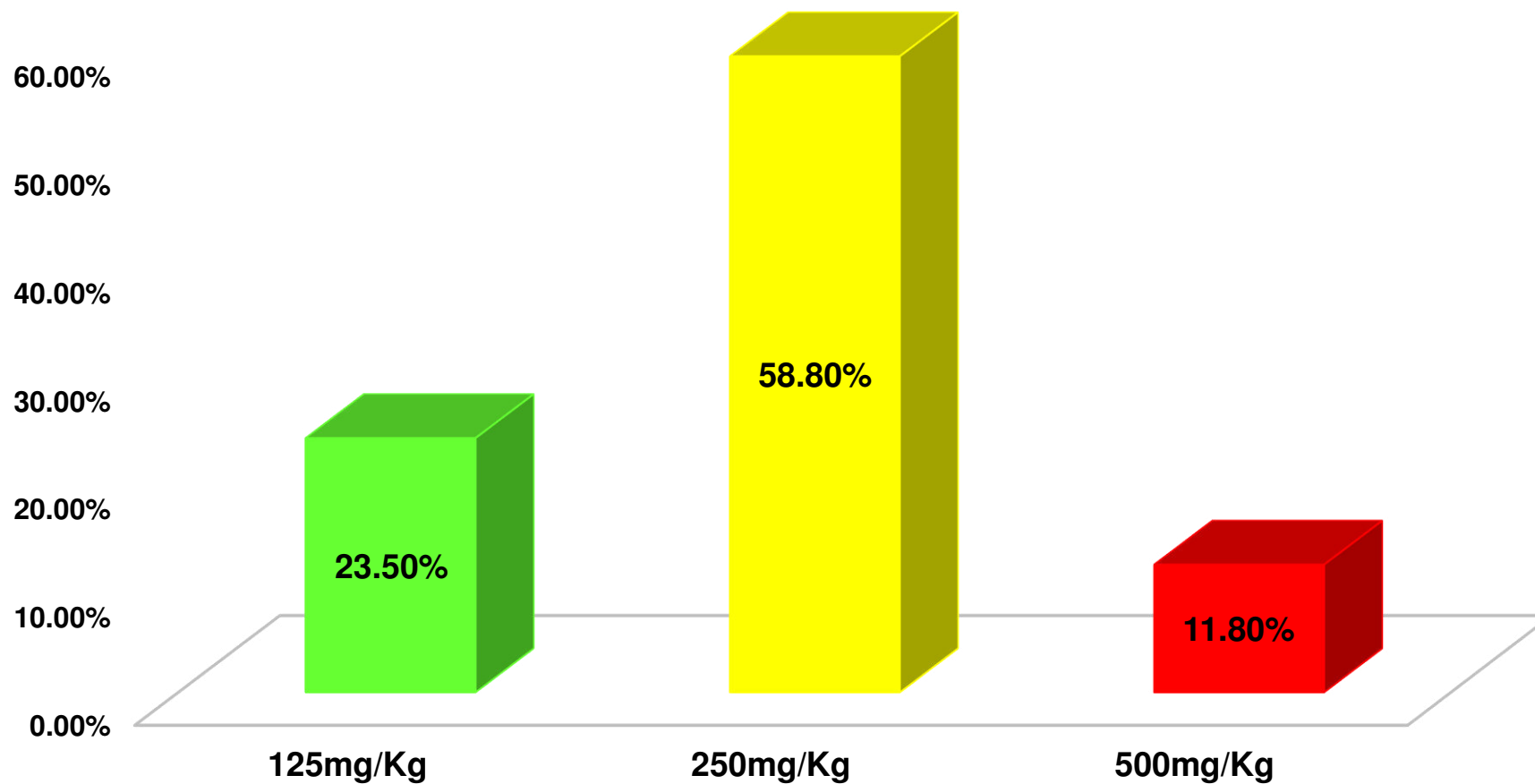


**Figura 24.** Actividad antiinflamatoria de las dosis de extracto y patrones.



**Figura 25.** Comparación de la eficacia del extracto de *Dalea isidori* Barneby respecto al naproxeno 50 mg/kg.

**Eficacia antiinflamatoria del extracto de *Dalea isidori* Barneby  
respecto al AAS 50 mg/Kg**



**Figura 26:** Comparación de la eficacia del extracto de *Dalea isidori* Barneby respecto al AAS 50 mg/Kg.

#### 4.3. Determinación del efecto analgésico en las diferentes dosis del extracto de Dalea isidori Barneby

**Tabla17:** Promedios del tiempo de reacción al dolor (TRD) de los tratamientos en el tiempo.

T	Tramadol 20 mg/Kg	Paracetamol 400 mg/Kg	125 mg/Kg	250 mg/Kg	500 mg/Kg	750 mg/Kg
0'	4,86	4,87	5,03	4,99	4,96	4,94
30'	5,09	4,99	5,21	5,08	5,08	4,97
60'	5,40	5,12	5,52	5,27	5,19	5,01
90'	5,97	5,32	5,90	5,59	5,20	5,08

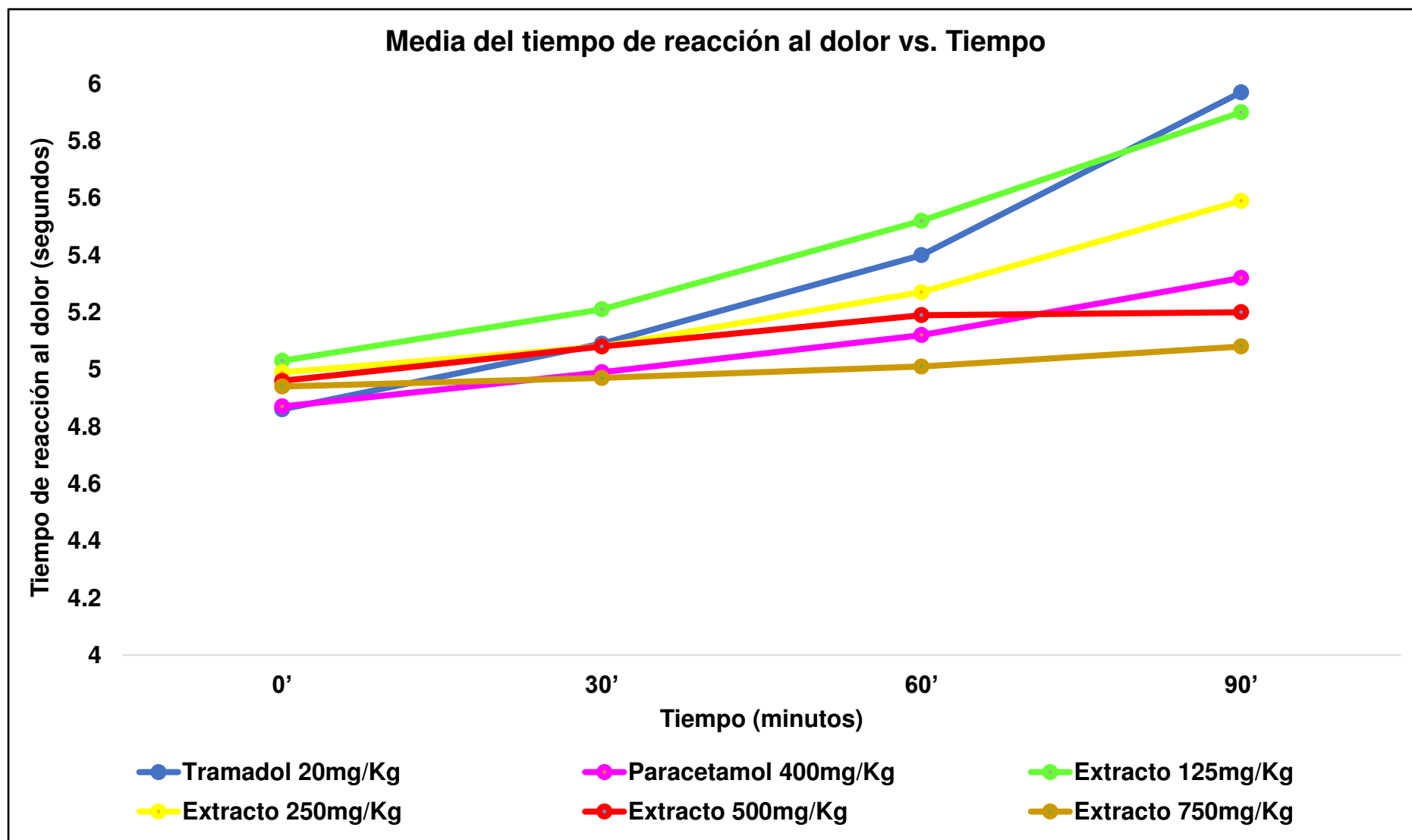
Para este caso se planteó:

$H_0$ : los promedios de TRD de los diferentes grupos experimentales son iguales.

$H_A$ : por lo menos uno de los promedios de TRD de uno de los grupos es diferente.

En el análisis estadístico ANOVA (**Anexo XV**), se observa que los promedios a los tiempos 0', 30', 60' no presentan diferencia significativa; por ello, se asume que los promedios son iguales entre sí (se acepta la  $H_0$ ), sin embargo, a los 90 minutos se evidencia diferencia significativa (se acepta la  $H_A$ ), lo que indica que los grupos difieren entre sí.

Así mismo, solo a los 90 minutos se toma en cuenta los resultados del test de Tukey, para que a través de las comparaciones múltiples se establezca que grupos son los que difieren entre sí y a su vez que dosis del extracto etanólico presenta mayor efecto analgésico.



**Figura 27.** Comparación de las medias de los tiempos de reacción al dolor vs. tiempo.

**Tabla 18.** Análisis estadístico (ANOVA y test de Tukey) de los datos del porcentaje del incremento del tiempo de reacción al dolor (%In.TRD) en la determinación del efecto analgésico del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.

T	Grupo	N	Media %In.TRD	DS	ANOVA	Tukey					
						Tramadol 20 mg/Kg	Paracetamol 400 mg/Kg	E. 125 mg/Kg	E.250 mg/Kg	E.500 mg/Kg	E.750 mg/Kg
30'	Tramadol 20 mg/Kg	6	4,7867	2,2302	0.008*	NS	NS	NS	NS	NS	0.005*
	Paracetamol 400 mg/Kg	6	2,5583	1,5693		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 125 mg/Kg	6	3,6333	1,9793		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 250 mg/Kg	6	1,8483	,96224		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 500 mg/Kg	6	2,4417	2,4235		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 750 mg/Kg	6	,7517	,58253		0.005*	NS	NS	NS	NS	NS
60'	Tramadol 20 mg/Kg	6	11,0300	4,1539	0.001*	NS	NS	NS	NS	NS	0.001*
	Paracetamol 400 mg/Kg	6	5,1833	3,9173		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 125 mg/Kg	6	9,8983	4,7398		NS	NS	NS	NS	NS	0.005*
	E. 250 mg/Kg	6	5,5683	3,7540		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 500 mg/Kg	6	4,7617	3,2469		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 750 mg/Kg	6	1,5233	1,2868		0.001*	NS	0.005*	NS	NS	NS
90'	Tramadol 20 mg/Kg	6	23,0317	4,5083	0.000*	NS	0.000*	NS	0.004*	0.000*	0.000*
	Paracetamol 400 mg/Kg	6	9,0233	4,2614		NS	NS	0.045	NS	NS	NS
	E. 125 mg/Kg	6	17,3533	6,3555		NS	NS	NS	NS	0.001*	0.000*
	E. 250 mg/Kg	6	12,0783	6,2017		NS	NS	NS	NS	NS	0.022*
	E. 500 mg/Kg	6	4,9267	2,9520		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 750 mg/Kg	6	2,9233	2,2323		NS	NS	NS	NS	NS	NS

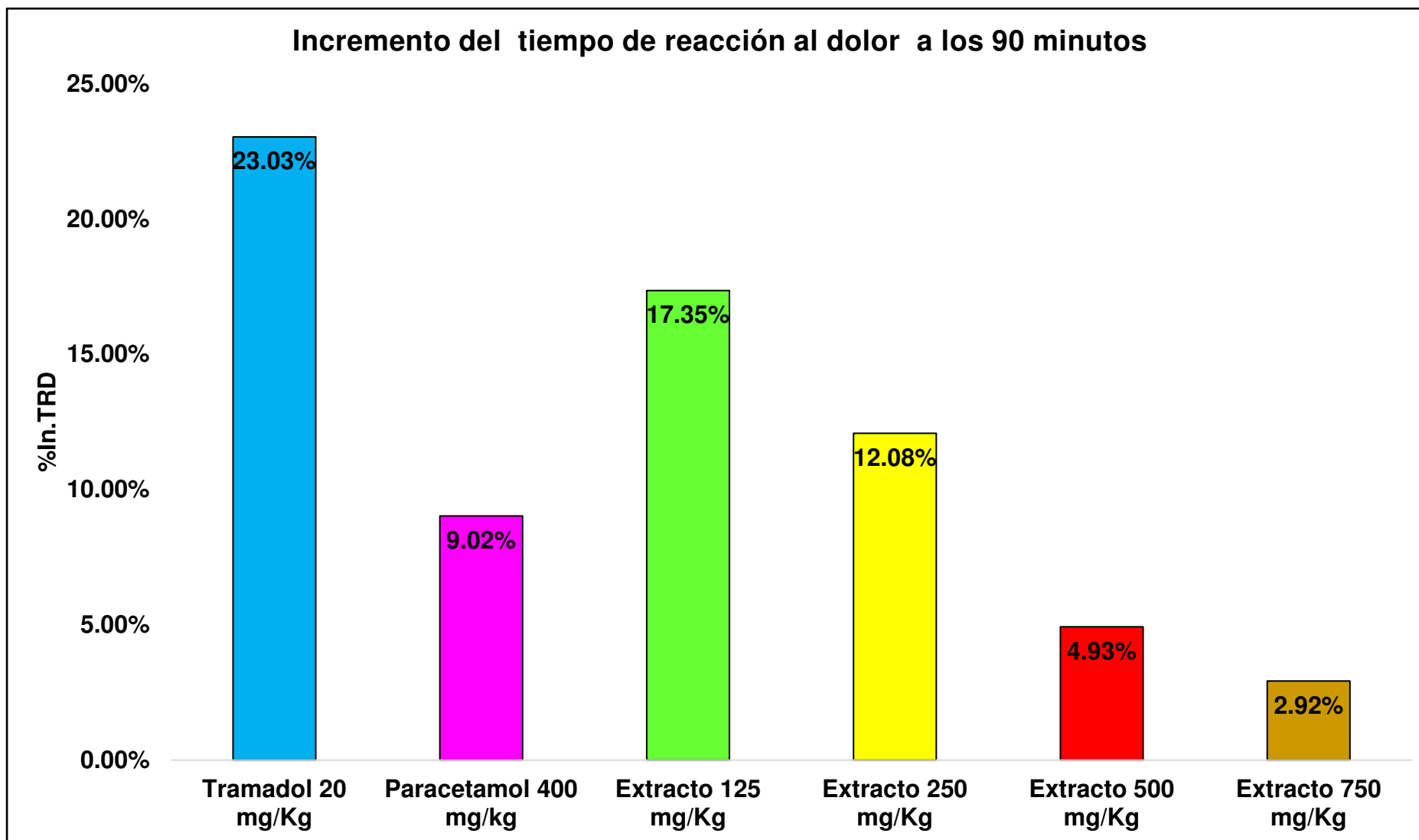
T, tiempo; N, número de animales; ', minutos; % In. TRD; incremento del tiempo de reacción al dolor en porcentaje; DS, desviación estándar; E., extracto. NS, No Significativo; \*P < 0.05 diferencia significativa, p> 0.05 no hay diferencia significativa.



Para el porcentaje del incremento del tiempo de reacción al dolor (% In.TRD), al igual que en los casos anteriores se establece una  $H_0$  y una  $H_A$ .

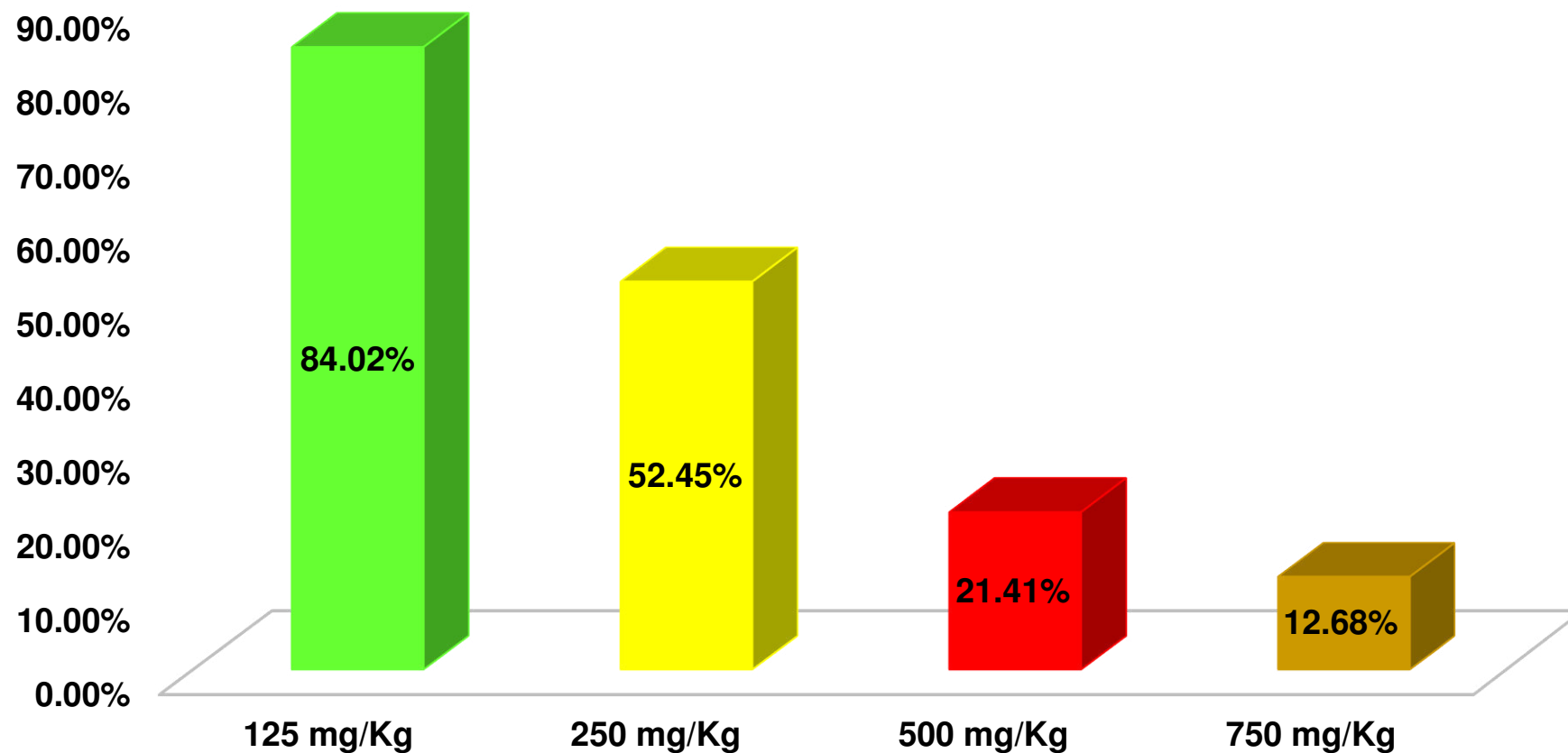
De la **Tabla 18**, el análisis de ANOVA evidencia que los promedios del % In.TRD tienen diferencia significativa en todos los tiempos, por lo tanto, se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_A$ .

Para establecer que grupos son los que difieren entre sí, se realizó el test de Tukey; evidenciando que a los 90 minutos los resultados fueron más representativos (**Figura 28**), es decir, se evidenció el mayor efecto analgésico.

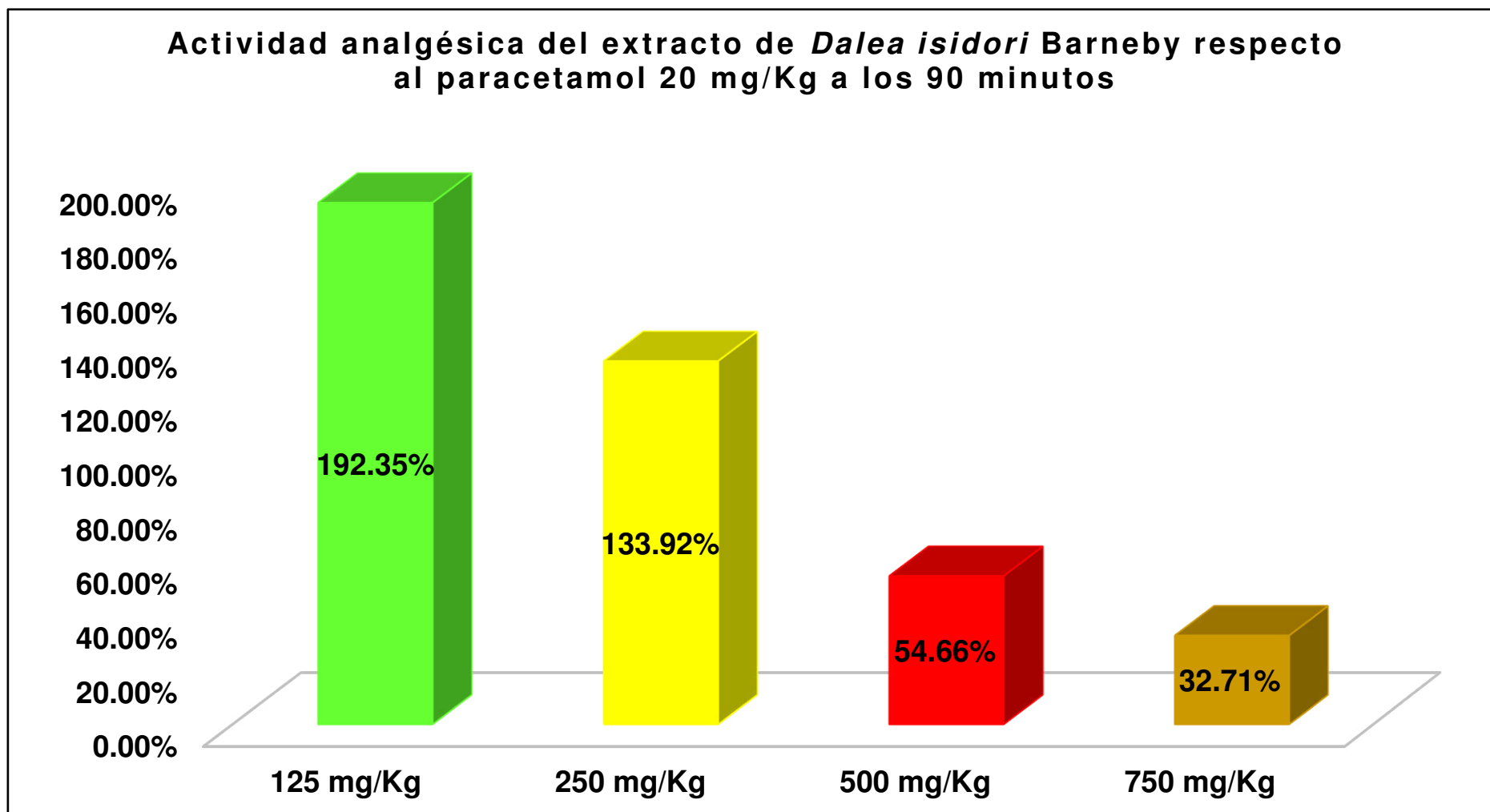


**Figura 28.** Representación en barras del porcentaje del incremento del tiempo de reacción al dolor (% In. TRD) a los 90 minutos en la prueba de efecto analgésico del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.

**Actividad analgésica del extracto de *Dalea isidori* Barneby respecto al tramadol 20 mg/Kg a los 90 minutos**



**Figura 29.** Comparación de la actividad analgésica del extracto de *Dalea isidori* Barneby respecto al tramadol 20 mg/Kg.



**Figura 30.** Comparación de la actividad analgésica del extracto de *Dalea isidori* Barneby respecto al paracetamol 400 mg/Kg.

#### 4.4 Determinación del DL50 oral

**Tabla 19.** Resumen de los principales signos y comportamientos según el Test de Irwin del grupo A.

	Actividad	30 m	1h	2h	3h	4h	24h	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d
<b>R1</b>	AE	4	4	1	2	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Pasividad	0	0	3	1	0	0	0	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Grooming	4	4	1	2	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	AM	4	4	2	3	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Analgesia	0	1	1	2	2	0	0	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	RD	4	4	3	2	2	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
<b>R2</b>	AE	4	4	1	3	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Pasividad	0	0	3	1	0	0	0	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Grooming	4	4	1	2	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	AM	4	4	3	3	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Analgesia	0	0	1	2	2	0	0	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	RD	4	3	3	2	2	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
<b>R3</b>	AE	4	4	1	3	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Pasividad	0	0	0	0	0	0	0	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Grooming	4	4	1	3	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	AM	4	4	2	3	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Analgesia	0	2	2	2	2	0	0	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	RD	4	2	2	2	2	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN

Escala numérica de 0 a 4. VN (valores Normales). AE (actividad espontánea), VN: 4; Pasividad, VN: 0; Grooming, VN: 4; AM (actividad motora), VN: 4; Analgesia, VN: 0; RD (respuesta al dolor), VN: 4.

**Tabla 20.** Resumen de los principales signos y comportamientos del Test de Irwin que variaron segundo grupo B.

	Actividad	30 m	1h	2h	3h	4h	24h	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d
<b>R4</b>	AE	4	4	1	2	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Pasividad	0	0	3	1	0	0	0	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Grooming	4	4	1	2	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	AM	4	4	2	3	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Analgesia	0	1	2	2	2	0	0	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	RD	4	4	2	2	2	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
<b>R5</b>	Actividad E	4	4	1	2	3	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Pasividad	0	0	3	2	2	0	0	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Grooming	2	2	1	3	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	AM	4	4	2	3	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Analgesia	0	2	3	3	3	0	0	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	RD	4	2	1	1	1	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
<b>R6</b>	AE	4	4	1	3	3	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Pasividad	0	0	3	1	0	0	0	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Grooming	4	4	1	3	4	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	A M	4	4	2	2	3	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	Analgesia	0	1	1	2	2	0	0	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
	RD	4	4	3	2	2	4	4	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN

Escala numérica de 0 a 4. VN (valores Normales). AE (actividad espontánea), VN: 4; Pasividad, VN: 0; Grooming, VN: 4; AM (actividad motora), VN: 4; Analgesia, VN: 0; RD (respuesta al dolor), VN: 4.

Los demás signos y comportamientos que se evaluaron en el Test de Irwin, no fueron alterados durante el tiempo que duró el estudio.  
(Anexo X)

**Tablas 21.** Resultados del control de pesos inicial y final en la determinación de DL50 oral del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby y la ganancia de peso en porcentaje.

Grupo	Animales	Peso inicial	Peso final	Ganancia de peso %	Media de la ganancia de peso %	SD
Grupo A	R1	28	29	3.57	6,1267	4,3162
	R2	27	28	3.70		
	R3	27	30	11.11		
Grupo B	R4	27	28	3.70	10,36	6,4921
	R5	28	31	10.71		
	R6	24	28	16.67		

SD, Desviación estándar R1, ratón 1; R2, ratón 2; R3, ratón 3; R4, ratón 4; R5, ratón 5; R6, ratón 6.

**Tabla 22.** Resumen del examen microscópico de los principales órganos de los ratones. (**Anexo X**)

<b>Animal</b>	<b>Corazón</b>	<b>Pulmón</b>	<b>Hígado</b>	<b>Riñón</b>
<b>A1 (blanco)</b>	Congestión moderada, algunas fibras presentan hipertrofia observándose núcleo prominente. Infiltración ligera de grasa a nivel del miocardio y pericardio.	Parénquima normal con leve congestión. Alveolos y bronquiolos abiertos y vacíos.	Moderada congestión aguda con leve degeneración centrolobulillar.	Congestión aguda leve. Vénulas, capilares peritubulares en la zona cortical y medular dilatados y cargados de eritrocitos. Integridad del epitelio tubular
<b>R2</b>	Congestión moderada. Fibras miocárdicas levemente desordenadas, presentan hipertrofia en gran cantidad. Infiltración ligera de grasa a nivel del miocardio.	Parénquima levemente congestionado. Sin alteración a nivel de alveolos y bronquiolos.	Moderada congestión aguda y moderada degeneración centrolobulillar.	Congestión aguda leve. Vénulas, capilares glomerulares y peritubulares cargados de eritrocitos. Integridad de epitelio tubular
<b>R3</b>	Congestión moderada. Fibras miocárdicas desordenadas e hipertrofia marcada. Infiltración ligera de grasa a nivel del miocardio.	Parénquima con moderada congestión Ligeramente edema.	Severa congestión aguda con degeneración peri y centrolobulillar.	Congestión aguda moderada. Vénulas, capilares glomerulares y peritubulares cargados de eritrocitos. Integridad de epitelio tubular.
<b>R5</b>	Congestión severa. Fibras miocárdicas levemente desordenadas e hipertrofia muy marcada. Infiltración moderada de grasa a nivel pericárdico.	Parénquima con marcada congestión además de una extravasación de eritrocitos en la luz de alveolos. Moderado edema.	Severa congestión aguda con degeneración peri y centrolobulillar; inicios de necrosis centrolobulillar.	Congestión aguda leve. Vénulas, capilares glomerulares y peritubulares cargado de eritrocitos. Integridad de epitelio tubular.



## V. DISCUSIÓN

La especie *Dalea isidori* Barneby “Yerbechil” es utilizada tradicionalmente por los pobladores de Cajamarca, por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas digestivas, entre otros; sin embargo, no hay información científica que corrobore dichas propiedades terapéuticas.

Se revisó trabajos de investigación con el fin de establecer nuestra metodología de trabajo. Villena et al.<sup>8</sup>, determinó el efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea*, en ratas, según el modelo de edema subplantar inducido por carragenina y el edema auricular inducido por xilol. Hoyos y Yep<sup>10</sup> determinaron el efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de la especie de *Baccharis latifolia* “Chilco”, según método del edema plantar inducido por carragenina. Por otro lado, el estudio experimental de Toro<sup>12</sup>, evaluó la actividad analgésica aguda y crónica de *Phytolacca dioica*; empleando el ensayo de retirada de la cola “Tail-Flick” (TF), y el ensayo de placa caliente “Hot Plate” (HP), en ratones. Por ello, se decidió emplear el método de edema plantar inducido por carragenina y el método de retirada de la cola para la evaluación de los efectos antiinflamatorio y analgésico del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.

Se empleó el extracto alcohólico debido a que, según el estudio de Churampi y Montes<sup>9</sup>, el extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey “tumbo serrano” presentó efecto antinflamatorio y de acuerdo al estudio de Hoyos y Yep<sup>10</sup>, tanto los extractos acuosos como etanólicos presentan efecto antiinflamatorio. Se realizó la prueba de solubilidad del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby, así como la marcha fitoquímica, el análisis cromatográfico y la cuantificación de alcaloides totales.

Los resultados de la prueba de solubilidad de la **Tabla 10** (Anexo IV, Foto 1) muestran el comportamiento polar de los componentes presentes en el extracto, siendo muy soluble en metanol y etanol, poco soluble en cloroformo, n-butanol, n-hexano, acetato de etilo, benceno, ácido acético y agua destilada e insoluble en acetona y éter de petróleo. Basados en esto y según Kuklinski<sup>31</sup>, los componentes posiblemente presentes serían flavonoides en forma de aglicones y alcaloides como base libre y en su forma de sal.

En la marcha fitoquímica, **Tabla 11**, (Anexo V, Foto 2-18) se encontraron taninos (por la coloración verde oscura probablemente estarían en alta concentraciones, Velásquez<sup>48</sup>), aminoácidos, cardenólidos, quinonas, esteroides, alcaloides y flavonoides. Es importante mencionar, que en los estudios de Peralta et al. 2011<sup>3</sup>, Peralta et al. 2013<sup>4</sup>, Peralta et al. 2014<sup>7</sup>, Arango et al.<sup>5</sup>, Guffantte<sup>6</sup> y Belofsky et al.<sup>49</sup>; se aislaron flavanonas y flavanonas preniladas en otras especies *Daleas*.

Adicionalmente, se procedió a la identificación por cromatografía los compuestos flavonoides y alcaloides, por ser los compuestos a los que se les atribuye que presentan actividad antiinflamatoria (Martínez<sup>15</sup>, Hoyos y Yep<sup>10</sup>) y propiedades analgésicas (Lock<sup>30</sup>), (**Tabla 10**).

En el proceso de identificación de flavonoides, **Tabla 12**, se logró una buena separación con el sistema de solventes butanol-ácido acético-agua (4:1:5), (Anexo VI, Foto 22-23). Se obtuvo para las muestras del extracto M 1.1 y M 1.2 los R<sub>f</sub>s de 0.30 y 0.29, respectivamente, las cuales fueron comparados con quercetina por sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias y rutina por sus propiedades antiinflamatorias (Bonkanka<sup>37</sup>). Se obtuvo para el estándar de quercetina un R<sub>f</sub> de 0.897 y para el estándar de rutina R<sub>f</sub> de 0.576, demostrándose así la ausencia de

rutina y quercetina en la muestra, lo cual se corroboró al visualizar la placa cromatográfica con vapores de amoníaco y a la lámpara de luz UV, donde la rutina evidenció una coloración amarilla y la quercetina una coloración amarillo-anaranjado, mientras que las muestras del extracto mostraron una coloración anaranjada-verdosa y para todos los casos, se observó fluorescencia. Debido a la coloración de las manchas de las muestras del extracto de *Dalea isidori* Barneby, según Lock<sup>30</sup>; posiblemente se tratarían de auronas con 4'OH libre y algunas chalconas 2- ó 4-OH. Sin embargo, también podríamos sospechar de la presencia de flavanonas y flavanonas preniladas, las cuales fueron aisladas en algunas especies de *Dalea* como: *Dalea Elegans* (Peralta et al.2014<sup>7</sup>), *Dalea Boliviana* (Peralta et al. 2011<sup>3</sup>). *Dalea Searlsiae* (Belofsky et al.<sup>47</sup>), *Dalea coerulea* (Arango et al.<sup>5</sup>), *Dalea mustii* (Guffantte<sup>6</sup>).

En tanto para la identificación de alcaloides, **Tabla 13**, (Anexo VI, Foto 19-21), se utilizó el sistema de solventes cloroformo-metanol-amoniaco (10:1:1), dando un buen rendimiento, elucidando dos fracciones (F1 y F2) las cuales al ser reveladas con reactivo de Dragendorff, la F1 presentó una coloración verde y no la coloración característica anaranjada (Lock<sup>30</sup>), sin embargo, la F2 sí.

La F1 de ambas muestras del extracto presentaron un Rf similar a la estricnina, obteniéndose lo siguiente: M1.1= 0.562, M1.2= 0.559 y estricnina= 0.56. Esta misma fracción vista en lámpara con luz UV, evidenció una doble coloración (un fondo azul con un verde sobrepuesto), asimismo el estándar de estricnina evidenció similar coloración azul. En consecuencia, el extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby probablemente presente alcaloides de naturaleza similar a la estricnina (indólicos, derivados del triptófano), Kuklinski<sup>31</sup>. La F2 de ambas muestras del extracto presentaron los siguientes Rf: para M 1.1= 0.8 y para M.1.2 = 0.85, las cuales

visualizadas en lámpara de luz UV evidenciaron una coloración azul tenue, la cual no se evidenció en ningún otro estándar empleado.

La cuantificación de alcaloides totales, **Tabla 14** (Anexo XIII), se realizó con la finalidad de corroborar la presencia de estos metabolitos secundarios en el extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby obteniéndose 0.95 %, lo cual es equivalente a 950 mg de alcaloides totales por cada 100 g de extracto seco, que a su vez equivale a 128 mg de alcaloides totales por cada 100 g de la planta de *Dalea isidori* Barneby (0.128 %).

Luego se prosiguió con la determinación del efecto antiinflamatorio y para tal fin, se trabajó según el método del edema plantar inducido por carragenina (Sugishita et al<sup>40</sup>. y CYTED<sup>41</sup>). Según Hoyos y Yep<sup>10</sup>, el mayor efecto de la carragenina se logra entre las 3 y 5 horas de su administración, sin embargo, en este estudio se evidenció que tal efecto se presentó a las 2 horas, tiempo en el que se observa tendencia a la baja de la meseta formada en la **Figura 23**, además también se observa en dicha figura que la dosis de 250 mg/Kg del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby, presenta mayor efecto antiinflamatorio respecto a las otras dosis del extracto, pero menor respecto a los patrones (AAS 50 mg/Kg y naproxeno 50 mg/Kg).

En la **Tabla 16** y **Figura 24** se muestran los resultados obtenidos de la actividad antiinflamatoria los cuales son: 4%,10% y 2% con la dosis de 125 mg/Kg, 250 mg/Kg y 500 mg/Kg del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby, respectivamente; 17 % para AAS 50 mg/Kg y 22% para naproxeno 50 mg/kg. Con estos resultados se procedió a realizar la comparación de la eficacia antiinflamatoria del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby con cada uno de los fármacos patrones. En la **Figura 25**, se compara la eficacia antiinflamatoria de las tres dosis del extracto respecto al naproxeno 50 mg/Kg, obteniéndose 18.20%, 45.50% y 9.10% con las dosis de 125

mg/Kg, 250 mg/Kg y 500 mg/Kg, respectivamente. Asimismo, la **Figura 26** compara la eficacia antiinflamatoria de las tres dosis del extracto respecto al AAS 50 mg/Kg, obteniéndose 23.50%, 58.80% y 11.80% con las dosis de 125 mg/Kg, 250 mg/Kg y 500 mg/Kg, respectivamente. Dichos resultados evidencian que la dosis de 250 mg/Kg del extracto de *Dalea isidori* Barneby, tiene el mayor efecto antiinflamatorio.

Se realizó la determinación del efecto analgésico del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby, para lo cual se utilizó el test de retirada de la cola Tail-Flick (González-Darder<sup>44</sup>).

En la **Figura 27** se evidencia que el tiempo de reacción al dolor (TRD) tiene una tendencia a aumentar con el transcurrir de los minutos, lo cual demuestra el efecto analgésico del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby. En el Anexo XV se muestra el análisis ANOVA y el test de Tukey de los valores del TRD de los datos tabulados en la **Tabla 17** estableciendo cuál(es) de las dosis (125 mg/kg, 250 mg/Kg, 500 mg/Kg y 750 mg/Kg) presenta mayor efecto analgésico a un tiempo determinado. Los datos obtenidos a 0, 30 y 60 minutos, no evidenciaron diferencia significativa por lo cual no se pudo establecer diferencia alguna entre los grupos tratados con las muestras problema; sin embargo, los datos obtenidos a los 90 minutos sí presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Por ello, se procedió a realizar el test de Tukey, donde por comparaciones múltiples se obtuvo que las dosis de 125 mg/Kg, y 250 mg/Kg de extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby presentaron mayor efecto analgésico.

Para determinar el efecto analgésico, se calculó el porcentaje de incremento del tiempo de reacción al dolor (% In.TRD). En la **Tabla 18** se muestran las medias del % In.TRD, el análisis ANOVA y el test de Tukey de los mismos, donde observamos que a los 90 minutos, se evidencia mayor % In.TRD, por ello la en la **Figura 28** se

representa los porcentajes obtenidos, siendo 17.35%, 12.08%, 4.93% y 2.92% con las dosis de 125 mg/Kg, 250 mg/Kg, 500 mg/Kg y 750 mg/Kg del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby, respectivamente; 23.03% para el tramadol 20 mg/Kg y 9.02% para el paracetamol 400 mg/kg. En la **Figura 29**, se compara el porcentaje de la actividad analgésica de las cuatro dosis del extracto respecto al tramadol 20 mg/Kg, obteniéndose 84.02%, 52.45%, 21.41% y 12.68% con las dosis de 125 mg/Kg, 250 mg/Kg, 500 mg/Kg y 750 mg/Kg, respectivamente. Asimismo, la **Figura 30** compara el porcentaje de la actividad analgésica de las cuatro dosis del extracto respecto al paracetamol 20 mg/Kg, obteniéndose 192.35%, 133.92%, 54.66% y 32.71% con las dosis de 125 mg/Kg, 250 mg/Kg, 500 mg/Kg y 750 mg/Kg, respectivamente. Dichos resultados evidencian que la dosis de 125 y 250 mg/Kg del extracto de *Dalea isidori* Barneby, tiene el mayor efecto analgésico.

En la determinación de DL50 el extracto de *Dalea isidori* Barneby administrado por vía intragástrica del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby, de las **Tablas 19 y 20**, el 100% de los animales sobrevivieron, además los signos y comportamientos monitoreados en el test de Irwin (Anexo IX), presentándose una disminución de la actividad espontánea, grooming y actividad motora; las cuales disminuyeron pasadas las dos horas de iniciada la prueba. Respecto a la pasividad, esta se incrementó a las 2 horas de iniciada la prueba y regresó a la normalidad en las horas siguientes lo cual según Zevallos L<sup>50</sup>, sería indicador de una intoxicación ligera o leve. La analgesia se presentó en la mayoría de los ratones pasada la primera hora de iniciada la prueba y desapareció a las 24 horas. Transcurrido estos tiempos, los signos y comportamientos se mantuvieron de forma normal hasta el día 14 para ambos grupos. Referente al control de peso corporal realizado a los ratones, **Tabla 21**, se evidenció una ganancia de peso de 6,12 % y 10, 30% en los grupos A y B respectivamente, lo cual indica que

la administración oral de 2000 mg/Kg del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby, no afectó el desarrollo normal de los ratones. Adicionalmente, la **Tabla 22**, correspondiente al resumen de los resultados obtenidos en el informe histopatológico (Anexo XI), realizado por el laboratorio de histopatología y parasitología veterinaria de la Universidad Científica del Sur, evidenció que las lesiones observadas en el corazón, parénquima pulmonar, hígado y riñón, son compatibles con el tipo de muerte (tracción de la nuca) y la consecuente congestión general por la sobrecarga y trabajo cardíaco durante la agonía; mas no por la administración del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby. Sin embargo, la presencia de moderada a severa congestión aguda y degeneración peri y centrolobulillar en el tejido hepático, nos podría dar indicios de la probable actividad hepatotóxica del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.

Por lo expuesto anteriormente y según la OECD Guía 23<sup>38</sup> (Anexo X), clasificamos al extracto etanólico en la categoría 5 asignándole un DL50 mayor a 5000 mg/kg, acorde al Sistema Global Armonizado (GHS).

## VI.CONCLUSIONES

- El análisis fisicoquímico a través de la marcha fitoquímica, indicó la presencia de flavonoides, alcaloides, taninos, aminoácidos, cardenólidos, quinonas, esteroides y mediante el análisis cromatográfico se identificó de forma presuntiva alcaloides del tipo indólicos y flavonoides del tipo auronas, chalconas y flavanonas.
- La dosis de 250 mg/Kg del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby presentó mayor efecto antiinflamatorio.
- Las dosis de 125 mg/Kg y 250 mg/Kg del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby presentaron mayor efecto analgésico.
- La toxicidad aguda (DL50) del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby es mayor a 5000 mg/kg.



## VII.RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos experimentales para determinar cuál de las dosis (125 mg/Kg y 250 mg/Kg) tiene mayor efecto analgésico.
- Realizar estudios para evaluar el efecto antioxidante y antimicrobiano del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.
- Realizar otras investigaciones referentes a la seguridad del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.
- Diseñar una formulación farmacéutica para establecer su utilidad como una terapia alternativa contra la inflamación y el dolor.

## VII.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ruiz C, Iberico G, Saucedo A, Villar C. Conocimientos tradicionales Plantas Medicinales de Cajamarca. 1a ed. Cajamarca: CREAT SRL; 2012.p.18-19.
2. Benites J, Moitiro C, Figueiredo A, Rijo P, Buc-Calderon P., Bravo F. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of peruvian *Dalea strobilacea* Barneby. BLACPM. 2016;15(6):429-435.
3. Peralta M, Ortega M, Agnese A and Cabrera J. Prenylated Flavanones with Anti-tyrosinase activity from *Dalea boliviana*. J. Nat. Prod. 2011;74: 158-162.
4. Peralta M, Cabrera J, Pérez C. Potencialidad terapéutica de los flavonoides prenilados. Flavonoides prenilados como potenciales componentes de medicamentos. Rev. Fac. de Odontología UBA. 2013;28 (64):39-46.
5. Arango A, González J, Luque J, Moreno B. Actividad insecticida potencial de sesquiterpenos presentes en *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz et Thellung. Agronomía colombiana. 1994;11(2):164-174.
6. Guffante I. Screening de actividad antioxidante y citotóxica en *Artemia salina* de: *Arcytophyllum thymifolium*, *Salvia squalens*, *Justicia chlorostachya*, *Myrcianthes rhopaloides*, *Dalea mustisii*. [ Tesis para optar al título de Bioquímico Farmacéutico]. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2013.
7. Peralta M, Santi M, Agnese A, Cabrera J, Ortega M. Flavanoids from *Dalea elegans*: Chemical reassignment and determination of kinetics parameters related to their anti-tyrosinase activity. Phytochemistry Letters. 2014;10:260-267.

8. Villena N, César A, Arroyo A, Jorge L. Efecto Antiinflamatorio del Extracto Hidroalcohólico de *Oenothera rosea* (Yawar Socco) en ratas con inducción a la inflamación aguda y crónica. *Ciencia e Investigación*. 2012; 15(1):15-19.
9. Churampi L, Montes E. Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico del fruto de *passiflora mollissima* (kunth) *L.H.bailey* “tumbo serrano” y su uso como activo biológico en industria cosmética. [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
10. Hoyos K, Yep M. Diseño de una formulación de aplicación tópica a base de *Baccharis latifolia* (Chilca), con efecto antiinflamatorio. [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
11. Betancourt J, Goriti A, Córdova A, Ríos F, Ríos D, Flores G. Actividad analgésica del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Bixa Orellana* L. en ratones albinos. *Ciencia e investigación* .2006;9(2):69-72.
12. Toro V. Evaluación de la actividad analgésica aguda y crónica de *Phytolacca dioica*. [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Santiago. Universidad de Chile; 2009.
13. Wurback J. New *Melastomaceae Tomataceae* from Peru and Bolivia. *Brittonia*.1988;40(1):4-6,40.
14. Martínez M, Ocampo D, Galvis J, Valencia A. Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). *Rev Cubana Plant Med*.2011;16(4): 313-323.
15. Baldeon S, Flores M, Roque J. *Fabaceae* endémicas del Perú. *Rev. Perú. Biol*. 2006;13(2):302-337.

16. Vílchez A, Angulo J. Estudio de diagnóstico y zonificación para el tratamiento de la demarcación territorial de la provincia de San Marcos. Gobierno regional de Cajamarca.2005.
17. Villalba W. Inflamación I. Rev. Act. Clin. Med [revista en la Internet]. [citado 2017 Abr 22]. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2304-37682014000400004&lng=es](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014000400004&lng=es).
18. Brunton L, Chabner B, Knollmann B. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. 12a ed. México D.F.: Mc Graw Hill;2012. p.959-994.
19. Rang H, Dale M, Ritter J, Flower R, Henderson G. Farmacología. 7a ed. Barcelona:Editorial Elsevier.2012; p.319-321,503-524.
20. Ibarra E. Una Nueva Definición de "Dolor": Un Imperativo de Nuestros Días. Rev. Soc. Esp. Dolor.2006;13(2):65-72.
21. Olguín M. Estudio de la interacción entre paracetamol y meloxicam en el dolor térmico agudo. [Tesis para optar el título profesional de Cirujano Dentista]. Santiago. Universidad de Chile;2005.
22. Puebla F. Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S. Dolor. Oncología,2005; 28(3):139-143.
23. Guyton A, Hall J. Tratado de fisiología médica. 12a ed. Madrid: Gea consultoría editorial S.L.L.; 2009.p.434-436,583.
24. Romera E, Perena M, Perena M, Rodrigo M. Neurofisiología del dolor. Rev Soc Esp Dolor. 2000;7: Supl.II,11-17.
25. Patel N. Fisiología del dolor en: Guía para el manejo del Dolor en condiciones de bajos recurso. IASP.2010:13-18.

26. Serrano-Atero M, Peramo F, Cañas A, García-Saura P, Serrano-Álvarez C, Caballero J. Modulación Descendente de la Información nociceptiva (I). Rev Soc Esp Dolor.2002;9:382-390.
27. Rodríguez R. Guía de farmacología y terapéutica. 3a ed. Barcelona: Editorial Elsevier; 2014.p.75-81.
28. Hilal-Dandan R, Brunton L. Goodman & Gilman Manual de Farmacología y Terapéutica. 2a ed. México D.F.: Mc Graw Hill; 2015.p.322.
29. Lorenzo P, Moreno A, Leza J, Lizasoain I, Moro M, Portolés A. Velázquez Manual de Farmacología Básica y Clínica. Madrid: Editorial Médica Panamericana;2013. p.102-105.
30. Lock O. Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales. 2a ed. Lima: PUCP Fondo Editorial;1994.p.3,111-126, 211-227.
31. Kuklinski C. Farmacognosia, Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. 1a ed. Barcelona: Editorial Omega; 2000.p.167-170, 177-183, 206-209.
32. Bruneton J. Farmacognosia, Fitoquímica Plantas Medicinales. 2a ed. Zaragoza: Editorial Acribia; 2001.p.306-325, 773-775.
33. Limón D, Díaz A, Mendieta L, Luna F, Zenteno E, Guevara J. Los flavonoides: Mecanismos de acción; Neuroprotección y Efectos Farmacológicos. Mensaje Bioquímico.2010; 34:143-154.
34. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr.2004; 79:727-47.
35. Pérez G. Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. Rev Cubana Invest Biomed.2003;22(1):48-52.

36. Álvarez E, Orallo F. Actividad biológica de los flavonoides I. Acción frente al cáncer. OFFARM.2003; 22(10):130-139.
37. Bonkanka C. Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal. [Tesis doctoral]. Santa Cruz de Tenerife. Universidad de La Laguna;2006.
38. OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for testing of chemicals. Guideline no. 423: Acute Oral Toxicity -Acute Toxic Class Method, Paris. 2001.
39. Roux S, Sablé E, Porsolt R. Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function.2005.
40. Fuertes C, Roque M, Tristan M. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* C.C. Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. Ciencia e Investigación.2014;1(2):71-80.
41. Sugishita E, Amagaya S, Ogihara Y. Anti-inflammatory testing methods: Comparative evaluation of mice and rats.1981;4:565-566.
42. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Métodos de Evaluación de la Actividad Farmacológica de Plantas Medicinales. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 2002.
43. Diaz H. Actividad antiinflamatorio y antioxidante del extracto hidroalcohólico del látex de *Argemone mexicana* ("Cardo santo") [Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico] Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016.
44. Correa J, Iral R, Rojas L. Estudio de potencia de pruebas de homogeneidad de varianza. Revista Colombiana de Estadística.2006; 29 (1):57-76.

45. González-Darder J. Animal pain models and ethical issues regarding animal experimentation. Rev. Soc. Esp. Dolor.2000;7: 313-318.
46. Panlab Harvar Apparatus. Test de la retirada de la cola Tail Flick Test.
47. Wolfe M, Kennedy L, Na J, Nemzek-Hamlin J. Efficacy of tramadol as a sole analgesic for postoperative pain in male and female mice. Journal of the Ame. Assoc. for Lab. Sci.2015; 54(4):411-419.
48. Velásquez Á. Extracción de taninos presentes en el banano verde. Rev. Lasallista de investigación.2004;1(2):17-22.
49. Belofsky G, Aronica M, Foss E, Diamond J, Santana F, Darley J. Antimicrobial and antiinsectan phenolic metabolites of *Dalea searlsiae*. Journal of Natural Products.2014;17:1140-1149.
50. Zevallos L. Efecto sobre el músculo liso intestinal y toxicidad aguda oral del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* (chilca) [ Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Farmacología Mención en Farmacología Experimental] Lima.Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011.

# **ANEXOS**



## Anexo I



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA

**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

### CONSTANCIA N° 188-USM-2016

EL JEFE (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal recibida de **Camilo HONORIO URBINA y Margarita CAMACHO, SILVA**, estudiantes de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, ha sido estudiada y clasificada como: ***Dalea isidori*** Barneby y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ROSIDAE**

**ORDEN: FBALES**

**FAMILIA: FABACEAE**

**GENERO: *Dalea***

**ESPECIE: *Dalea isidori*** Barneby

Nombre vulgar: "hierba de chile"

Determinado por Blgo. Severo Baldeón Malpartida.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 13 de setiembre de 2016



**Mag. ASUNCION CANO ECHEVARRIA**  
JEFE (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

DDB

## Anexo II



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
FACULTAD DE ZOOTECNIA-DEPARTAMENTO ACADEMICO DE NUTRICION  
LABORATORIO DE EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE ALIMENTOS  
Av. La Molina s/n - La Molina  
TELEFAX 3480830

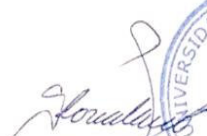
### CONSTANCIA

Por medio de la presente hago constar que:

El señor **CAMILO HONORIO URBINA**, ha realizado la compra de un total de 42 ratas albinas cepa Holtzman en el Laboratorio de Evaluación Biológica de Alimentos – Bioterio, de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria la Molina, según Boleta de Venta N° 6856 correspondiente al presente año.

Se extiende la presente, para los fines que el interesado estime conveniente.

La Molina, 12 de Octubre del 2016

  
**Ing. Gloria Palacios Pinto**  
Jefe del Laboratorio de Evaluación  
Nutricional de Alimentos



### Anexo III



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
Bioterio - Vicerrectorado de Investigación

## CERTIFICADO

San Martín de Porres, 21 de septiembre de 2016

Mediante la Presente se certifica que las 42 ratones, hembras, de la cepa albina Balb/c, adquiridos el 21 de septiembre de 2016 por el Sr. Camilo Honorio Urbina, Químico Farmacéutico de la UNMSM, están en perfecto estado sanitario y fisiológico, para ser utilizada en cualquier protocolo Biomédico.

Atentamente;

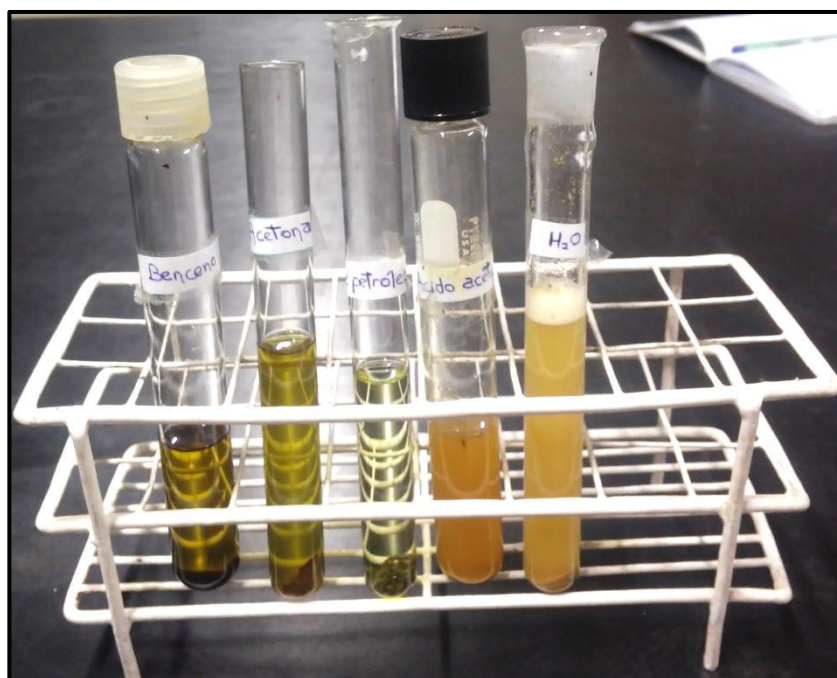
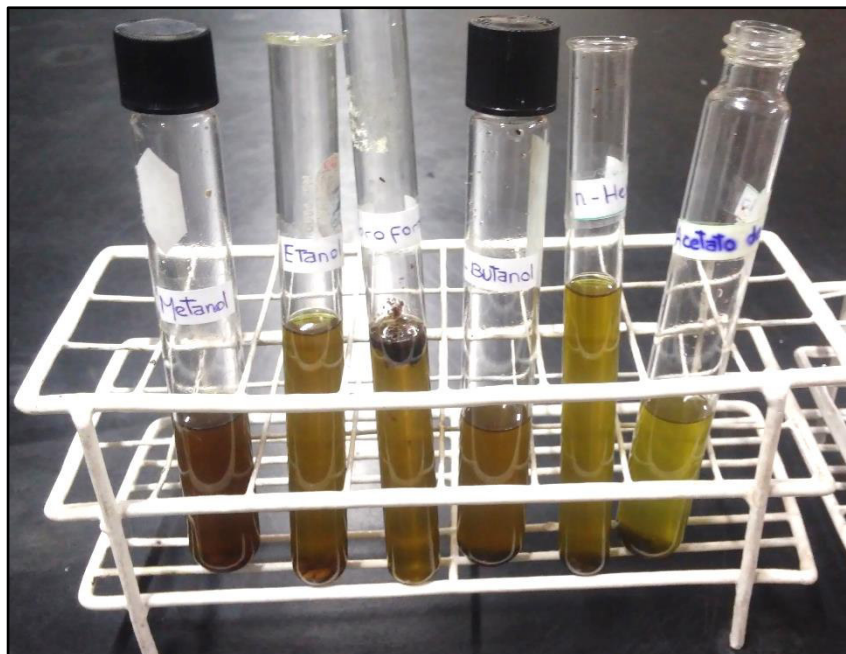


**Dr. CHRISTIAN PITOT ALVAREZ**  
Jefe de Bioterio  
LID - UPCH  
C.M.V. 8985

Av. Honorio Delgado 430, Lima 31. Apartado postal 4314, Lima 100  
Teléfono: (511) 319-0000 anexo: 2710  
E-mail: Christian.pitot@upch.pe

## Anexo IV

### Prueba de solubilidad del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby



**Foto 1.** Prueba de solubilidad del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby. Muy soluble en etanol y metanol. Insoluble en acetona y éter de petróleo. Solventes: metanol, etanol cloroformo, n-butanol, n hexano, acetato de etilo, benceno, acetona, éter de petróleo, ácido acético



## Marcha fitoquímica del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby

### Fracción A



**Foto 2.** Identificación de taninos. De izquierda a derecha. Identificación con reactivo de tricloruro de hierro, positivo (++++). e identificación con reactivo de gelatina, positivo (+++).



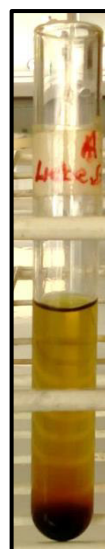
**Foto 3.** Identificación de aminoácidos con reactivo de ninhidrina. Positivo (+).



**Foto 4.** Identificación de cardenólidos con reactivo Keller-Killiani. Positivo (++).



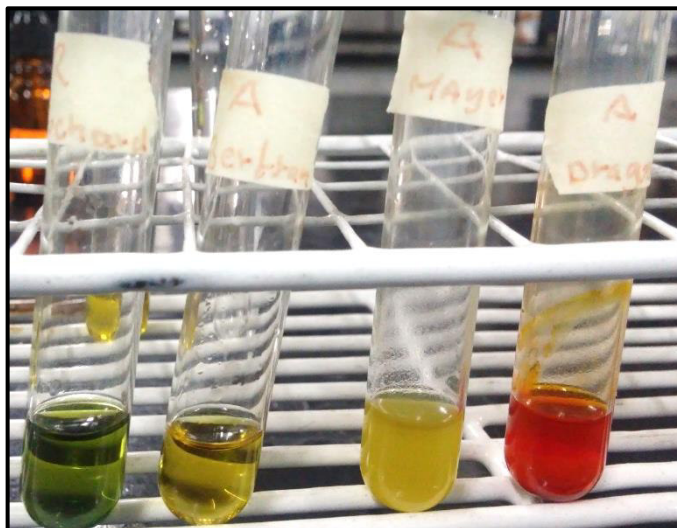
**Foto 5.** Identificación de quinonas con reactivo Borntrager. Positivo (++).



**Foto 6.** Identificación de esteroides con reactivo Liebermann Burchard. Positivo (+++).



**Foto 7.** Identificación de flavonoides con reactivo de Shinoda. Positivo (+++).



**Foto 8.** Identificación de alcaloides. De izquierda a derecha. Identificación con R. Bouchardar, positivo (++); identificación con R. Bertrand, positivo (+); identificación con R. Mayer, positivo (+) e identificación con R. Dragendorff, positivo (+++).

### **Fracción B**



**Foto 9.** Identificación de quinonas con reactivo de Borntrager. Positivo (++).



**Foto 10.** Identificación de esteroides con reactivo Liebermann Burchard. Positivo (++).

## Fracción C

### Fracción C<sub>1</sub>

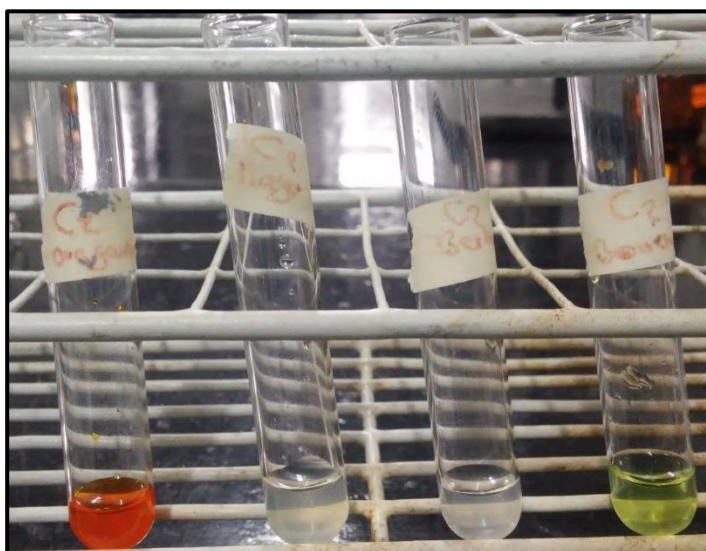


**Foto 11.** Identificación de cardenólidos con reactivo Keller-Killiani. Positivo (++).



**Foto 12.** Identificación de esteroides con reactivo Liebermann Burchard. Positivo (++).

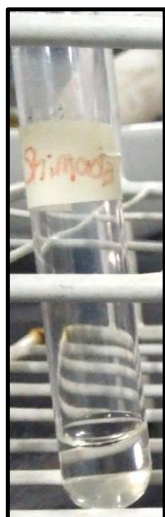
### Fracción C<sub>2</sub>



**Foto 13.** Identificación de alcaloides. De izquierda a derecha. Identificación con R. Dragendorff (++), identificación con Mayer (+), identificación R. Bertrand (+), identificación R. Sommenscheich (+).

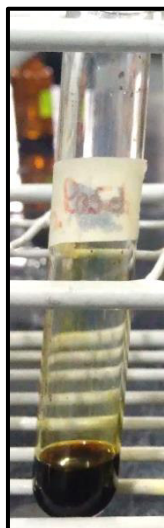
## Fracción D

### Fracción D<sub>1</sub>



**Foto 14.** Identificación de flavonoides con reactivo de Shinoda. Negativo (-).

### Fracción D<sub>2</sub>



**Foto 15.** Identificación de leucoantocianidinas con reactivo Rosenheim. Negativo (-).

### Fracción D<sub>3</sub>



**Foto 16.** Identificación de cardenólicos con reactivo Keller-Killiani. Negativo (-).

### Fracción D<sub>4</sub>



**Foto 17.** Identificación de esteroides con reactivo Liebermann Burchard. Positivo (+).

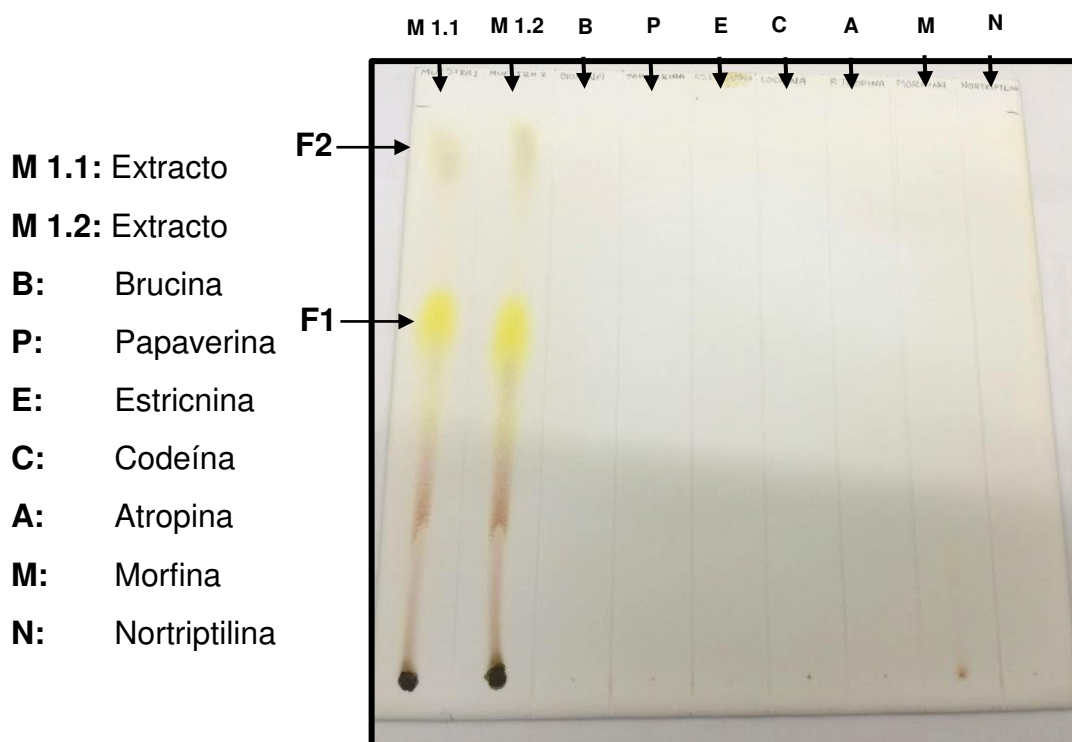


**Foto 18.** Identificación de alcaloides. De izquierda a derecha. Identificación con R. Dragendorff, positivo (+++) e identificación con R. Mayer, positivo (++)

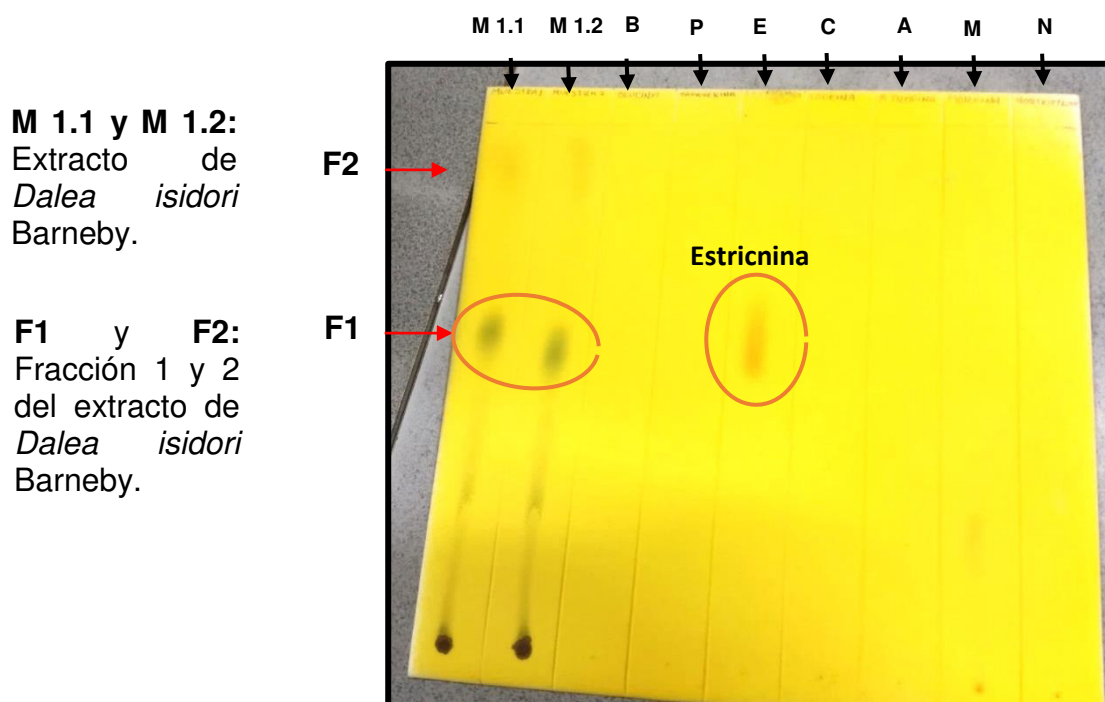


## Anexo VI

### Identificación cromatográfica del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby



**Foto 19. Identificación de alcaloides.** Cromatografía capa fina sin revelador de Dragendorff.



**Foto 20. Identificación de alcaloides.** Cromatografía capa fina con revelador de Dragendorff.

**M 1.1:** Extracto

**M 1.2:** Extracto

**B:** Brucina

**P:** Papaverina

**E:** Estricnina

**C:** Codeína

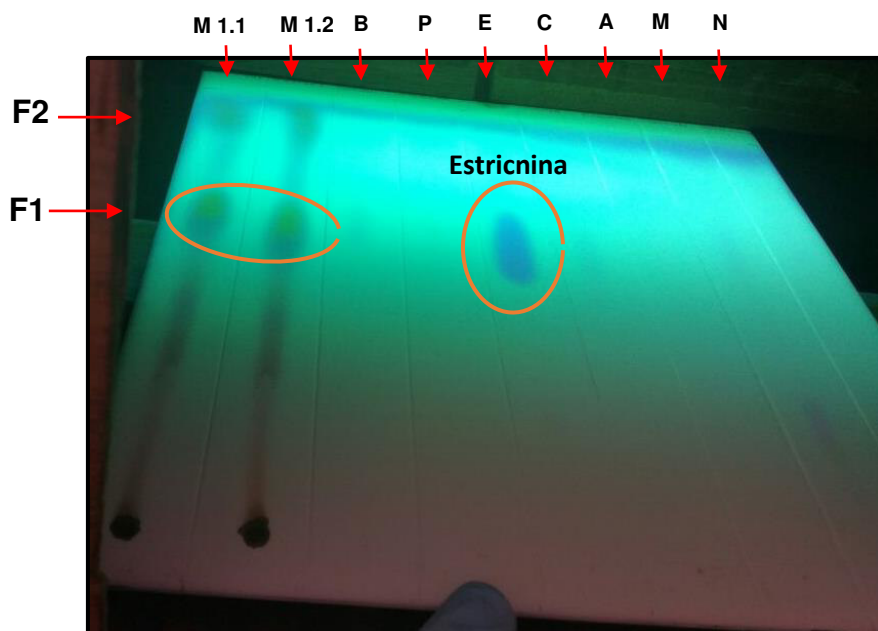
**A:** Atropina

**M:** Morfina

**N:** Nortriptilina

**Q:** Quercetina

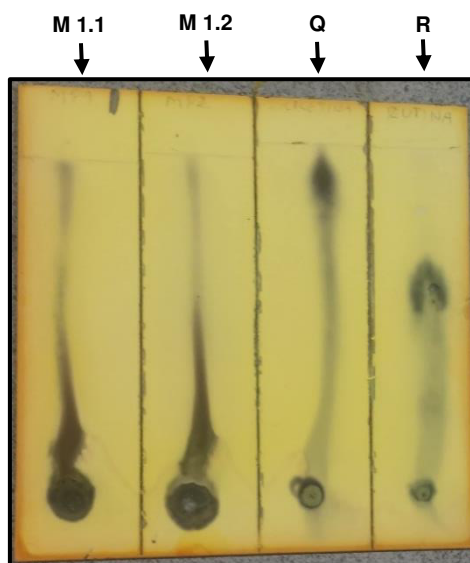
**R:** Rutina



**Foto 21. Identificación de alcaloides.** Cromatografía capa fina vista con luz UV.

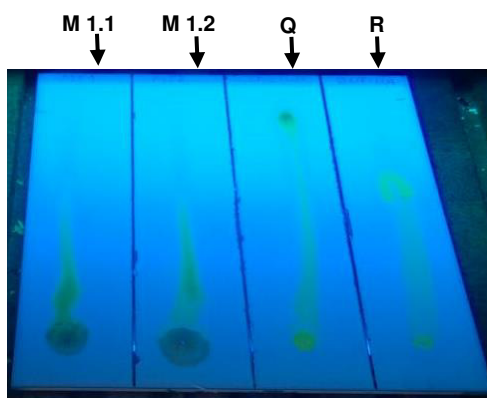
**F1 y F2:**  
Fracción 1 y 2  
del extracto de  
*Dalea isidori*  
Barneby.

**M 1.1 y M 1.2:**  
Extracto de  
*Dalea isidori*  
Barneby.



**Foto 22. Identificación de flavonoides.** Cromatografía capa fina con revelador de tricloruro de hierro.

**Foto 23. Identificación de flavonoides.** Cromatografía capa fina vista con amoníaco + luz UV.



## Anexo VII

### Determinación del efecto antiinflamatorio del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby



**Foto 24.** Extracto seco de *Dalea isidori* Barneby.



**Foto 25.** Grupos de animales de trabajo.



**Foto 26.** Lavado de la planta *Dalea isidori* Barneby.



**Foto 27.** Equipo: Pletismómetro digital PANLAB LE7500



## Anexo VIII

### Determinación del efecto analgésico del extracto seco de *Dalea isidori* Barneby.



**Foto 28.** Ratones hembras



**Foto 29.** Ensayo de la cola.



**Foto 30.** Equipo: Analgesímetro de foco Tail-Flick PANLAB LE7106



**Foto 31.** Equipo: Analgesímetro de foco Tail-Flick PANLAB LE7106 adaptado para ratones.

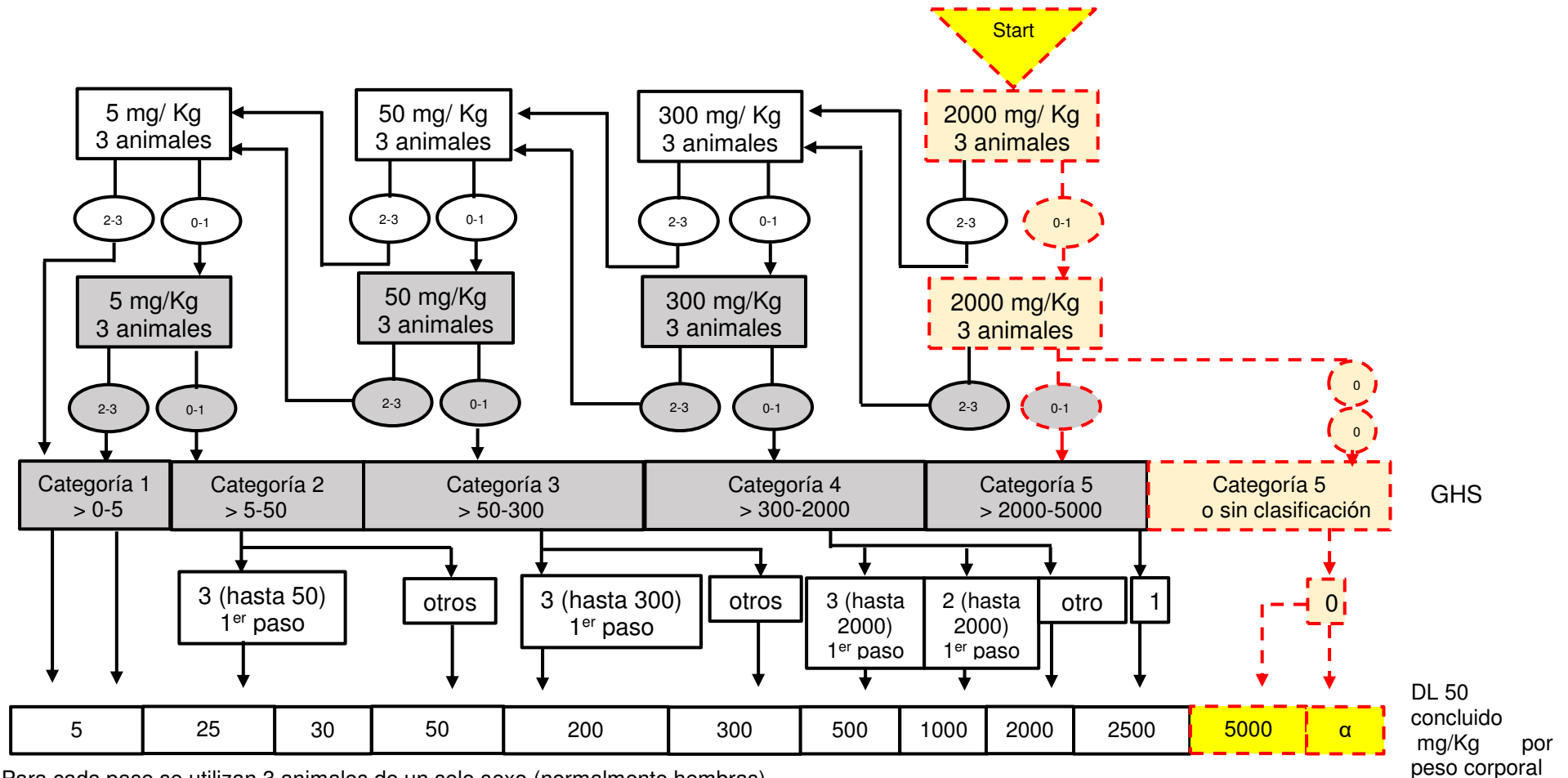
## Anexo IX

### Test de Irwin

		VN	Control	Muestra
I. Estado de Vigilia	1. Actividad espontánea	4		
	2. Foco visual	4		
	3. Esterotipia	0		
	4. Pasividad	0		
II. Conducta	1. Grooming	4		
	2. Vocalización	0		
	3. Inquietud	0		
	4. Irritabilidad	0		
	5. Temor	0		
III. Excitación del SNC	1. Actividad motora	4		
	2. Reacción de alarma	0		
	3. Cola de Straub	0		
	4. Temblores	0		
	5. Espasmos	0		
	6. Convulsiones clónicas	0		
	7. Convulsiones tónicas	0		
	8. Fasciculaciones	0		
	9. Frecuencia respiratoria	4		
	10. Amplitud respiratoria	4		
IV. Depresión del SNC	1. Actividad motora	4		
	2. Ataxia	0		
	3. Analgesia	0		
	4. Catatonía	0		
	5. Frecuencia respiratoria	4		
	6. Amplitud respiratoria	4		
V. Signos autonómicos	1. Ansiedad	0		
	2. Micción	4		
	3. Sialorrea	0		
	4. Frecuencia cardíaca	4		
	5. Frecuencia respiratoria	4		
VI. Efectos oculares	1. Enoftalmos	0		
	2. Exoftalmos	0		
	3. Diámetro pupilar	0		
	4. Reflejo pupilar	4		
	5. Reflejo oculoparpebral	4		
	6. Apertura palpebral	4		
	7. Lacrimación	0		
	8. Ptosis parpebral	0		
	9. Cromodaciorrea	0		
VII. Tono muscular	1. Tono de los miembros	4		
	2. Fuerza de aprehensión	4		
	3. Distensión corporal	0		
	4. Tono corporal	4		
	5. Tono abdominal	4		
VIII. Reflejos	1. Reflejo de flexión	4		
	2. Enderezamiento	4		
	3. Respuesta al tacto	4		
	4. Respuesta al dolor	4		
IX. Observaciones Dérmicas	1. Palidez	0		
	2. Hipertermia	0		
	3. Cianosis	0		
X. Muerte	1. Súbita	0		
	2. Lenta	0		

## Anexo X

### Procedimiento de ensayo con una dosis inicial de 2000 mg/ Kg por peso corporal



Para cada paso se utilizan 3 animales de un solo sexo (normalmente hembras).

-0,1,2,3: Número de moribundos o animales muertos para cada paso

-GHS: Sistema Global Armonizado (mg/Kg)

- α: Sin clasificación

UNIVERSIDAD CIENTIFICA DEL SUR  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y BIOLÓGICAS  
CARRERA DE MVZ

**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

**Anexo XI**

FECHA DE RECEPCIÓN	14/01/17	<b>CÓDIGO</b>  <b>HPL - 150A</b>
FECHA DE ENTREGA	28/01/17	

**INFORME HISTOPATOLÓGICO**

**Nombre del Propietario / Solicitante**

MARGARITA CAMACHO SILVA / CAMILO HONORIO URBINA.

Datos del Espécimen	Información de la Muestra
ESPECIE: RATAS	<input type="checkbox"/> CITOLOGIA
RAZA:	<input type="checkbox"/> POST-SACRIFICIO / MUERTE
SEXO:	<input type="checkbox"/> PIEZA OPERATORIA
EDAD:	<input type="checkbox"/> NECROPSIA
NOMBRE:	<input type="checkbox"/> COPROLOGÍA
	<input type="checkbox"/> RASPADO CUTÁNEO
	<input type="checkbox"/> TRICOGRAMA
<b>Recepcionado por:</b> ROSARIO RAMIREZ MARINA	
SARA CAROLINA PIZARRO R.	
<b>Antecedentes y/o Descripción:</b>	
LÁMINAS HISTOLÓGICAS CON MUESTRAS DE CUATRO ÓRGANOS: CORAZÓN, PULMÓN, HÍGADO Y RIÑÓN DE RATONES SOMETIDOS A UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.	
SE UTILIZÓ MICROSCOPIOS MARCA NIKON ECLIPSE E300, REALIZÁNDOSE LA OBSERVACIÓN A 3 AUMENTOS; 4 X, 10X Y 40X.	

## Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria

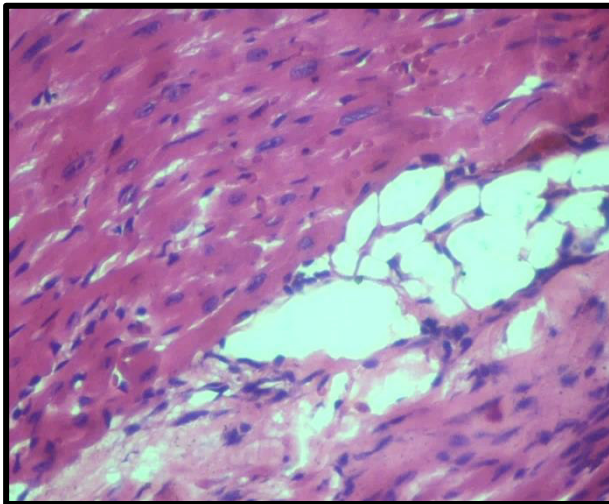
### Lectura de láminas

Se entregó 16 láminas para lectura histopatológica, cuatro órganos: corazón, pulmón, hígado y riñón.

Se utilizó microscopios marca NIKON Eclipse E300, realizándose la observación a 3 aumentos; 4 X, 10X y 40X.

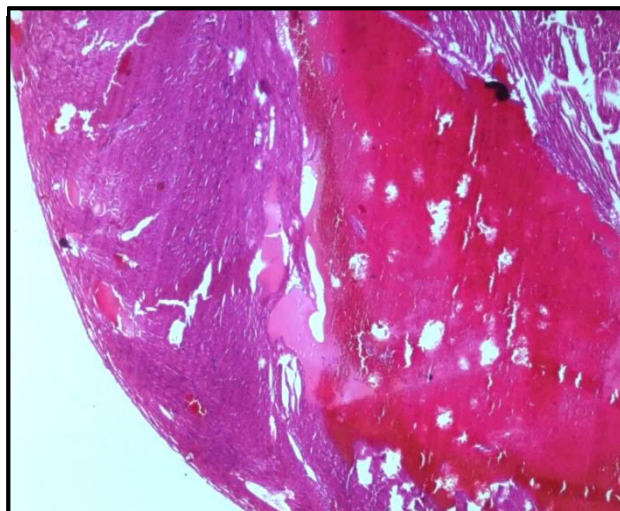
### CORAZÓN

#### 1) A1C



La muestra de corazón presenta una congestión moderada. Sin alteraciones en las fibras miocárdicas. Algunas fibras presentan hipertrofia, observándose un núcleo prominente. Ligera infiltración grasa a nivel de miocardio y pericardio.

**Foto 1.** Aumento 40X.

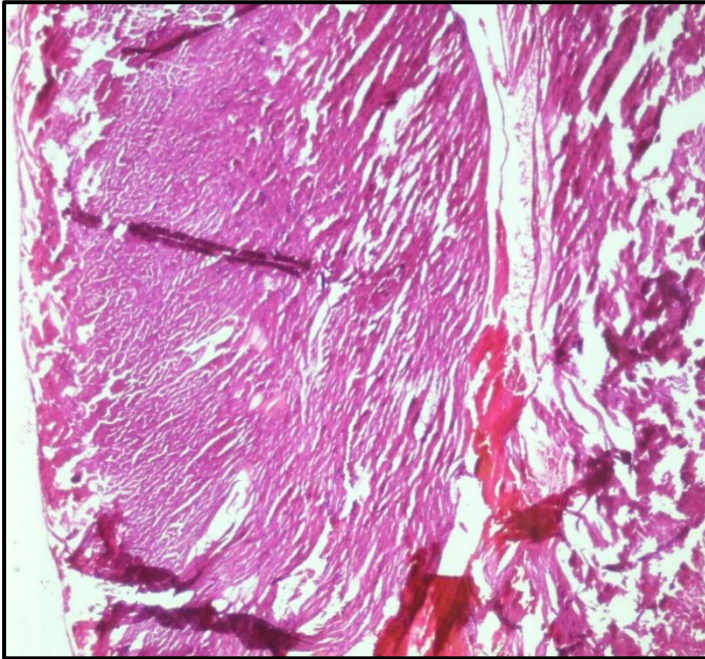


**Foto 2.** Aumento 10X.



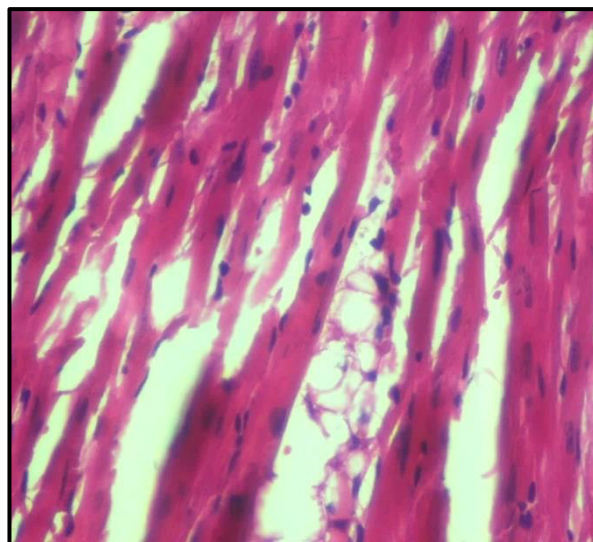
**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

2) R2C



La muestra de corazón presenta una congestión moderada. Fibras miocárdicas levemente desordenadas, presentan hipertrofia en gran cantidad. Se observa ligera infiltración grasa a nivel de miocardio.

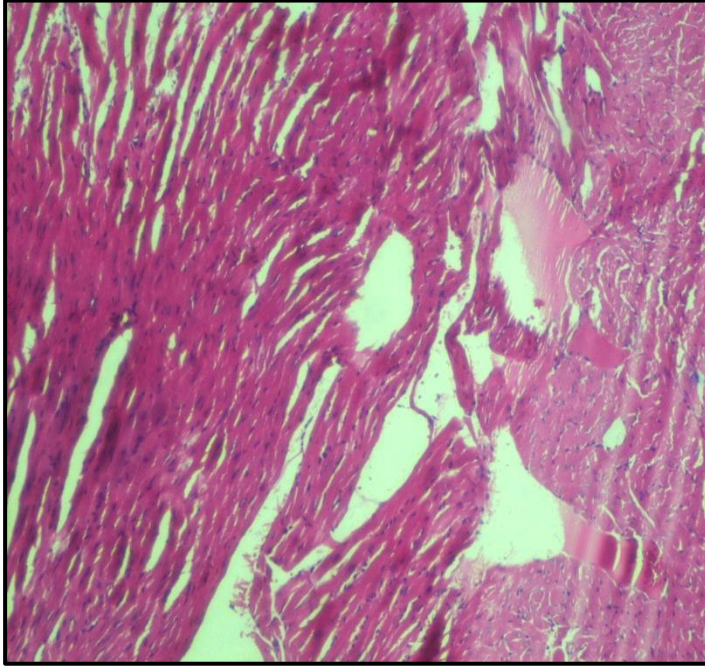
**Foto 3.** Aumento 4X.



**Foto 4.** Aumento 40X

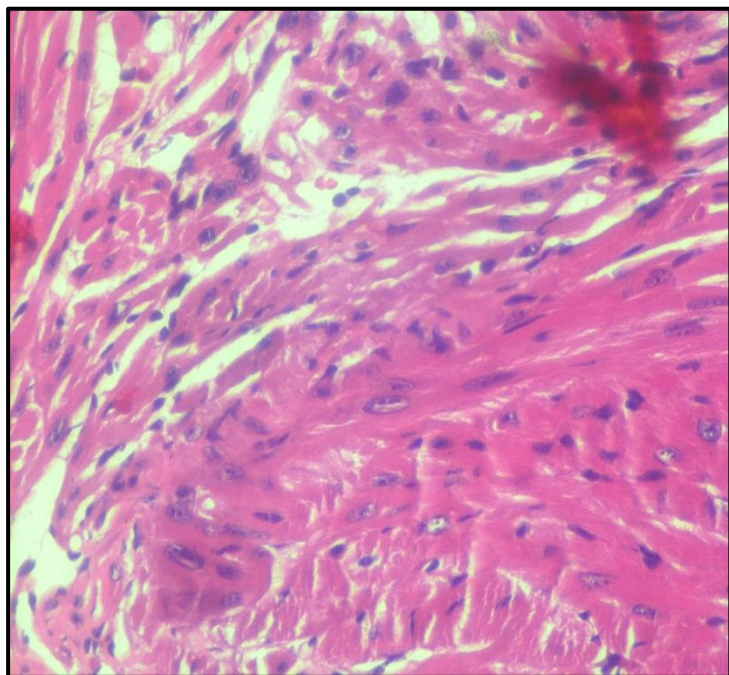
**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

**3) R3C**



La muestra de corazón presenta una congestión moderada. Fibras miocárdicas, desordenadas, las mismas presentan hipertrofia marcada. Además de una ligera infiltración grasa a nivel miocárdico.

**Foto 5.** Aumento 4X.

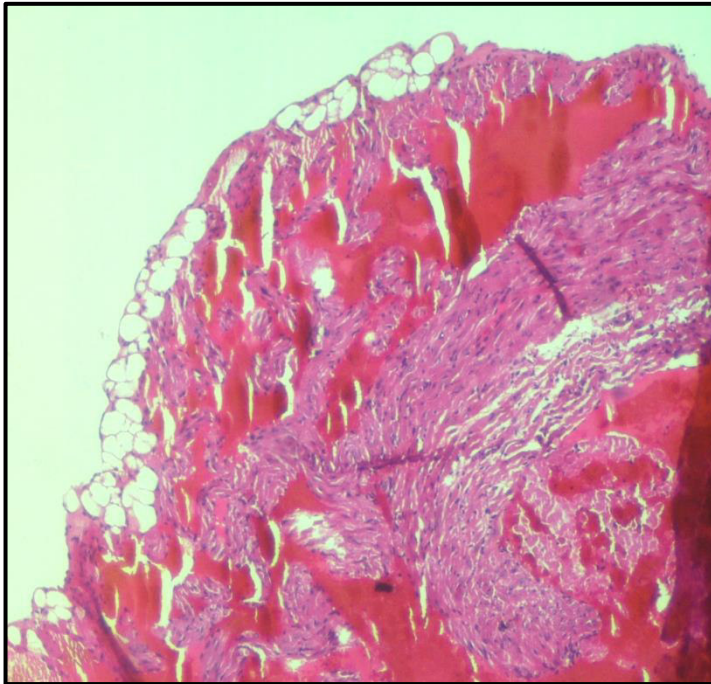


**Foto 6.** Aumento 40X



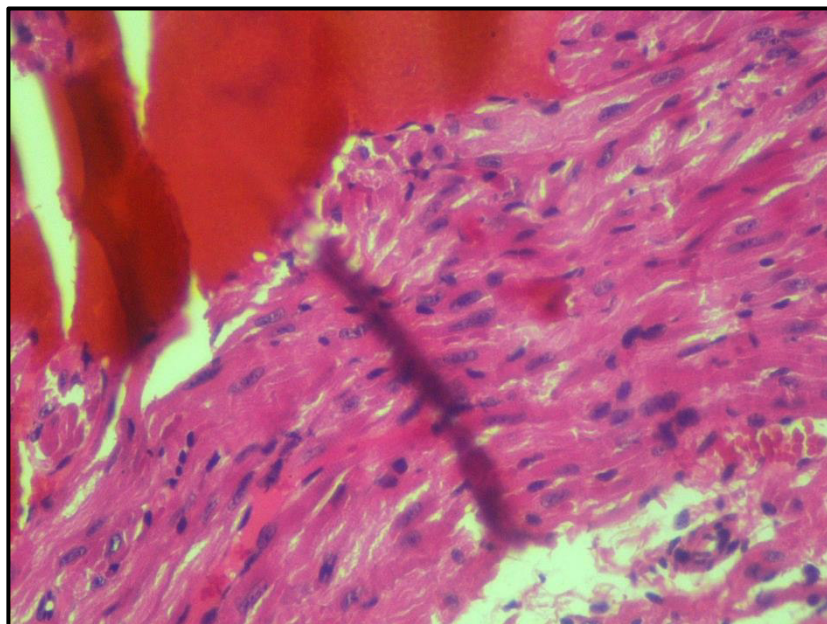
**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

**4) R5C**



La muestra de corazón presenta una severa congestión. Fibras miocárdicas levemente desordenadas. Hipertrofia de las fibras muy marcadas. Moderada infiltración grasa a nivel pericárdico.

**Foto 7.** Aumento 10X

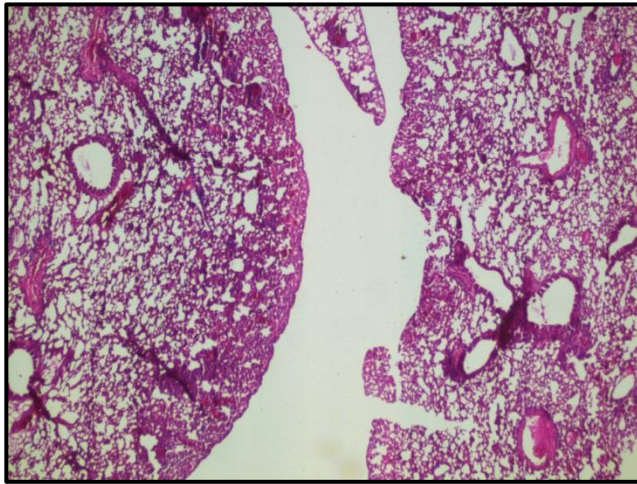


**Foto 8.** Aumento 40x.

**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

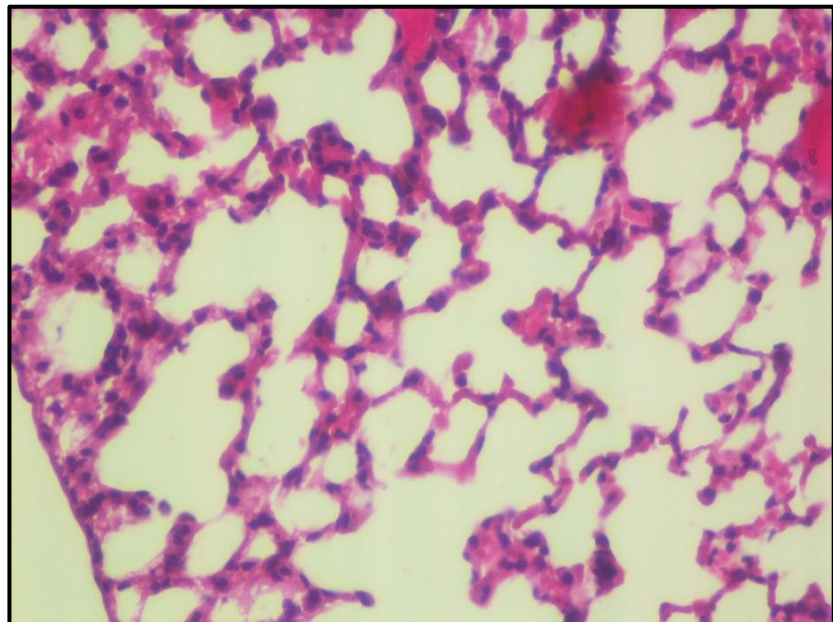
**PULMÓN**

1) A1PL



**Foto 9.** Aumento 4X.

La muestra de pulmón presenta un parénquima aparentemente normal. Con una leve congestión, Alveolos y bronquiolos abiertos y vacíos.

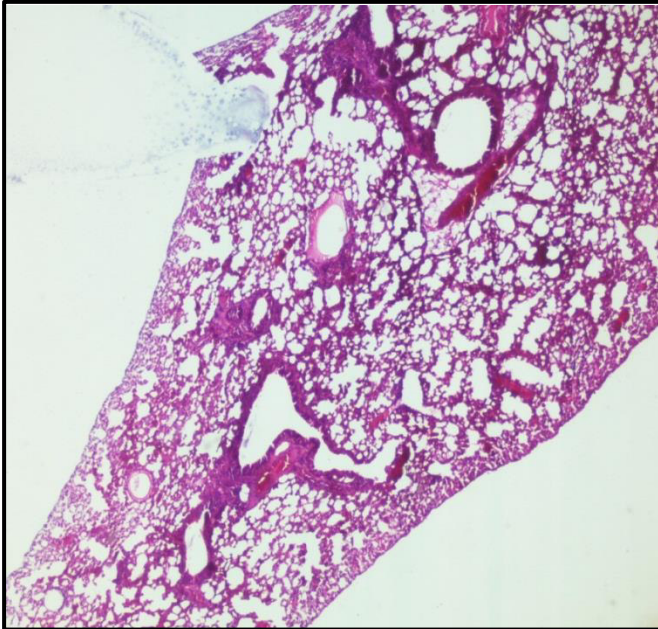


**Foto 10.** Aumento 40X



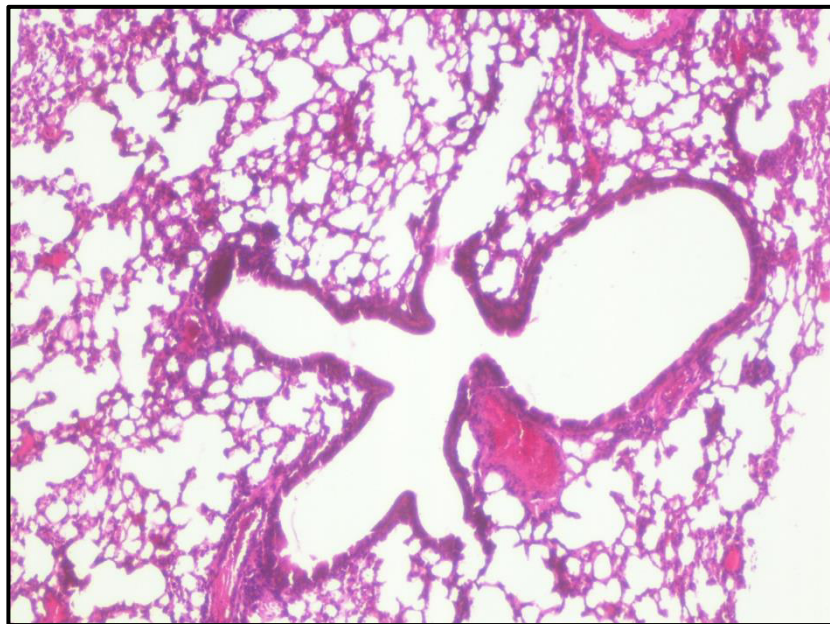
**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

2) R2PL



Parénquima pulmonar  
levemente congestionado.  
Sin alteración a nivel de  
alveolos y bronquiolos.

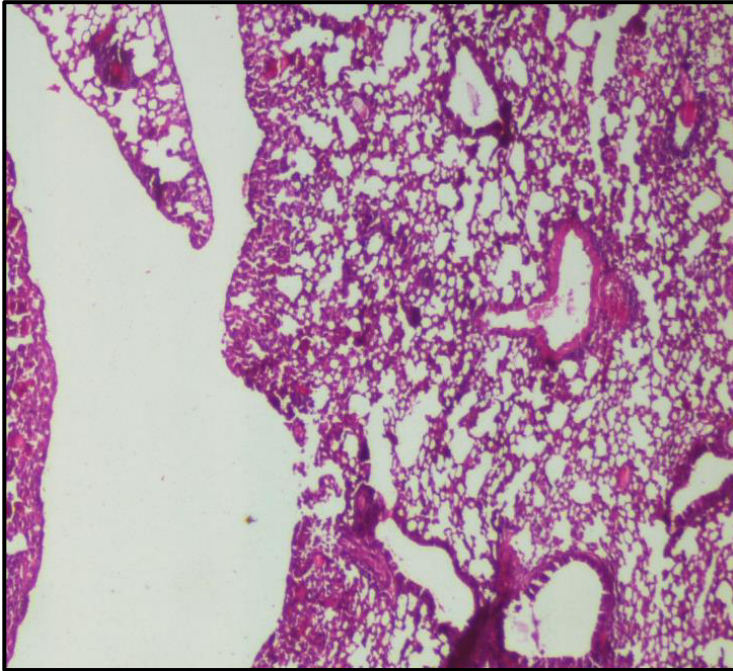
**Foto 11.** Aumento 4X.



**Foto 12.** Aumento 20X.

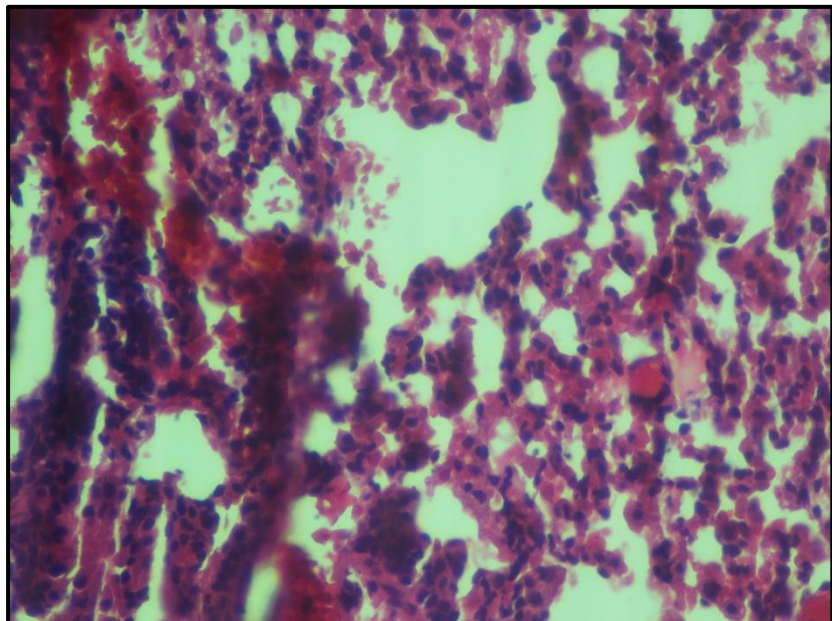
**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

3) 3PL



Parénquima pulmonar  
presenta una moderada  
congestión y ligero edema.

**Foto 13.** Aumento 4X.

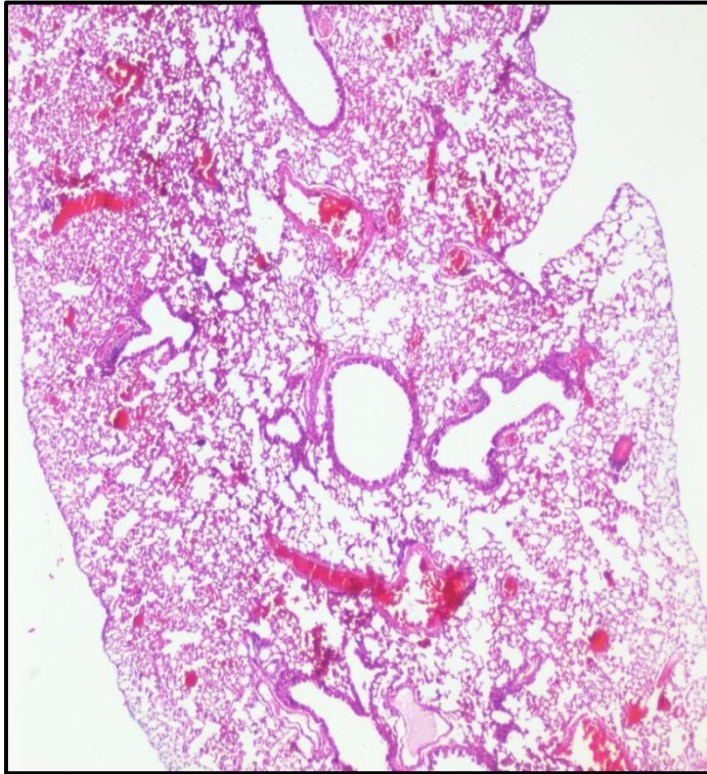


**Foto 14.** Aumento 20X.



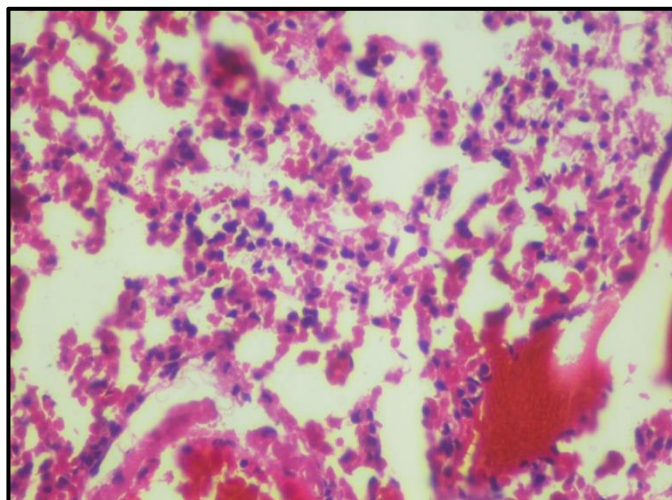
**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

4) R5PL



Parénquima pulmonar presenta una marcada congestión, además de una extravasación de eritrocitos en la luz de alveolos. Moderado edema.

**Foto 15.** Aumento 4X.

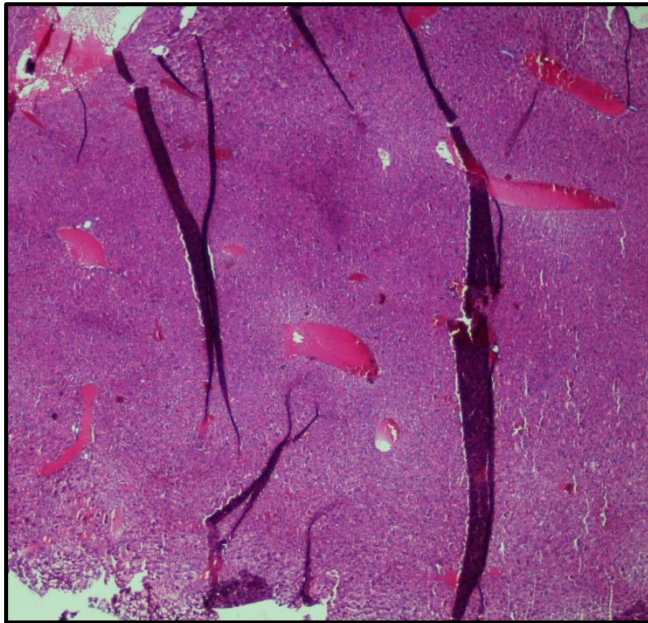


**Foto 16.** Aumento 40X

**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

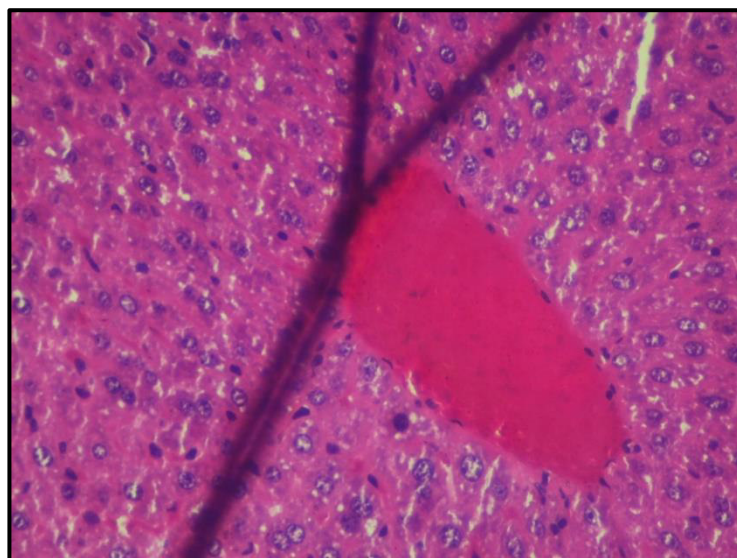
**HÍGADO**

1) A1H



Moderada congestión  
hepática aguda, con  
leve degeneración  
centrolobulillar.

**Foto 17.** Aumento 4X

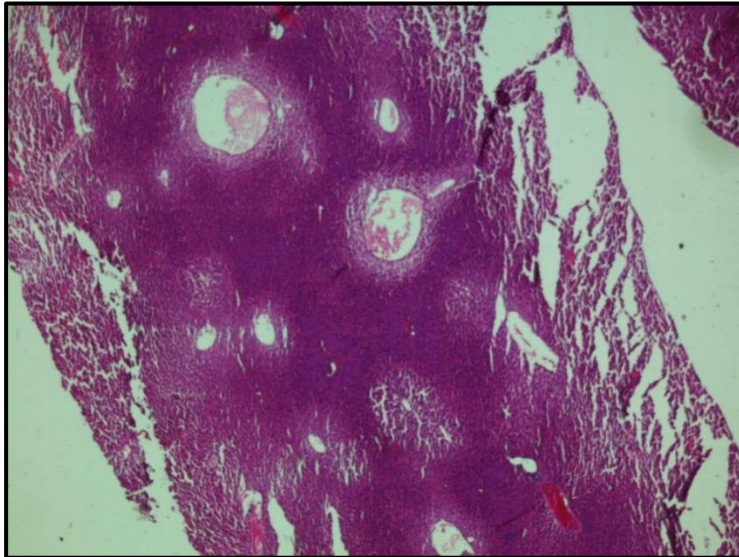


**Foto 18.** Aumento 40X



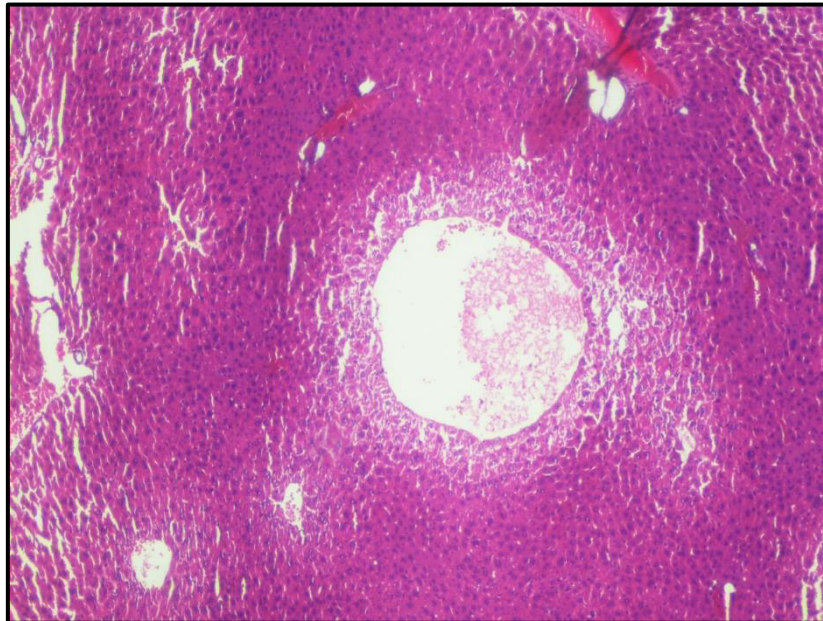
**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

2) R2H



Moderada congestión  
hepática aguda. Marcada  
degeneración  
centrolobulillar.

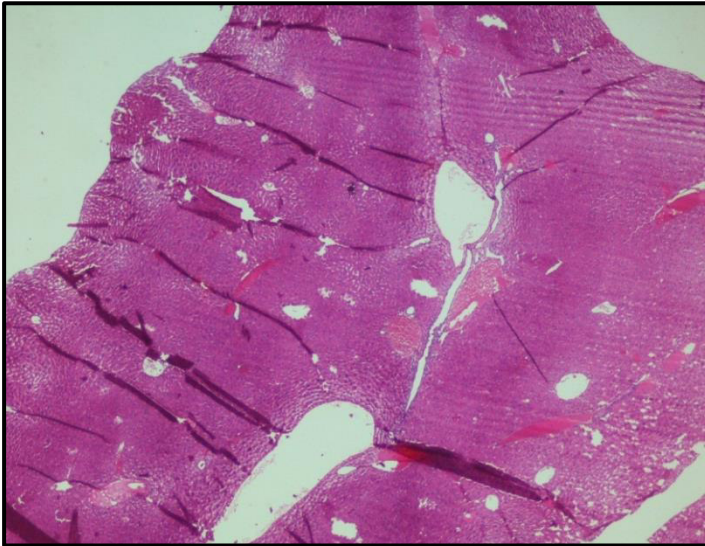
**Foto 19.** Aumento 4X



**Foto 20.** Aumento 20X

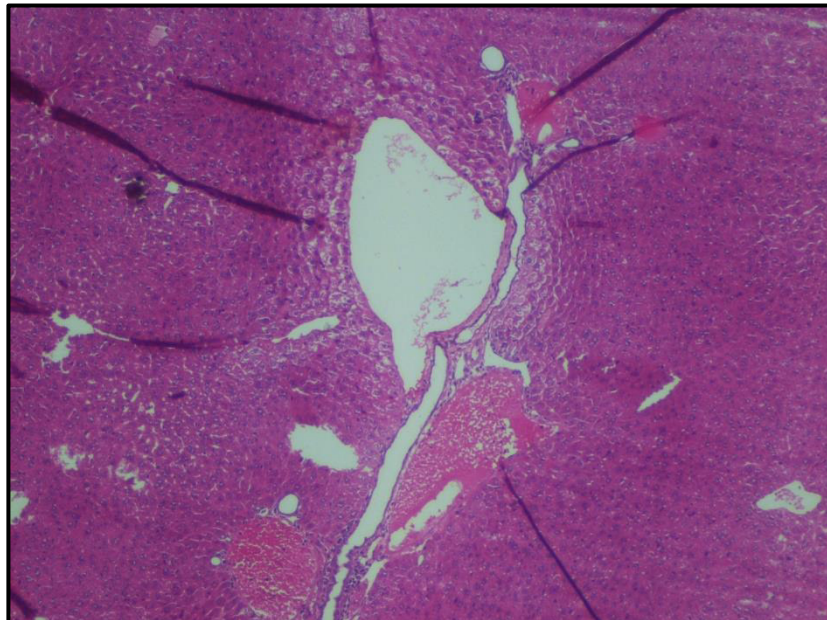
**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

3) R3H



Severa congestión hepática aguda. Degeneración peri y centro lobulillar.

**Foto 21.** Aumento 4X.

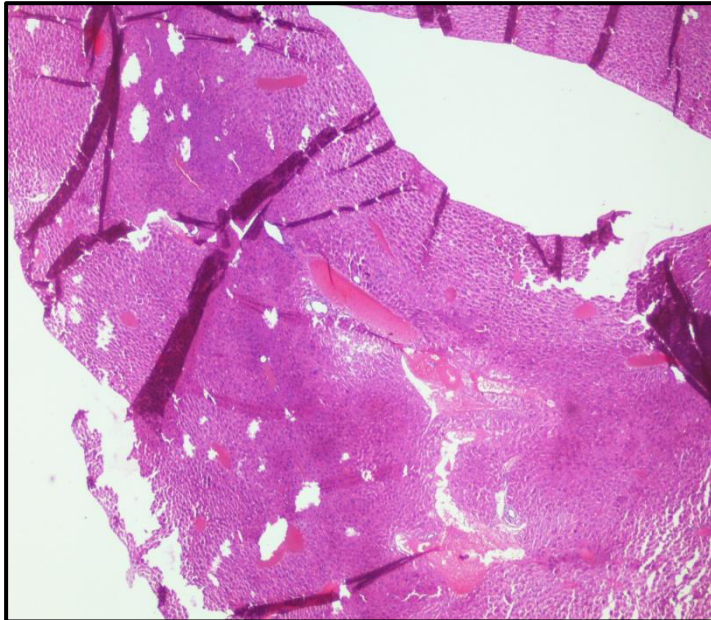


**Foto 22.** Aumento 20X.



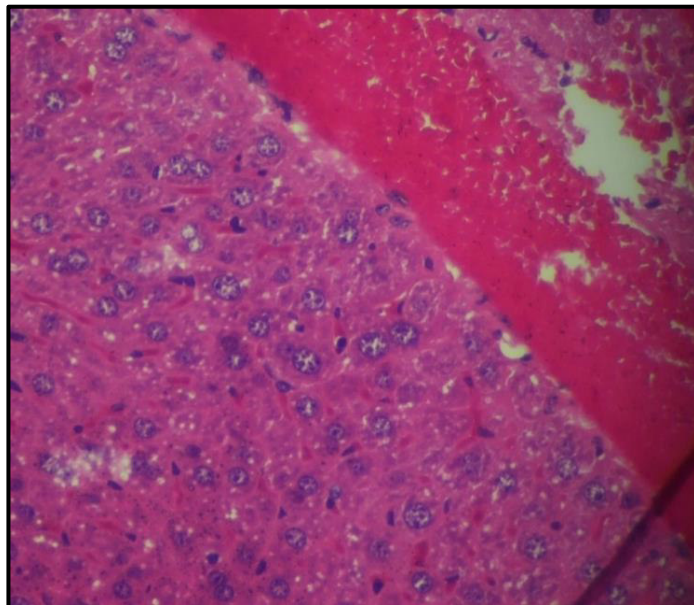
**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

4) R5H



Severa congestión hepática aguda. Degeneración peri y centro lobulillar, con inicios de necrosis centrolobulillar.

**Foto 23.** Aumento 4X.

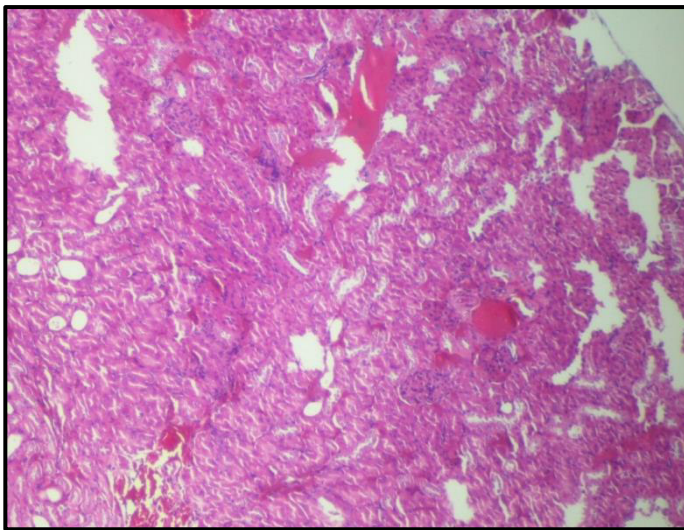


**Foto 24.** Aumento 40X

**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

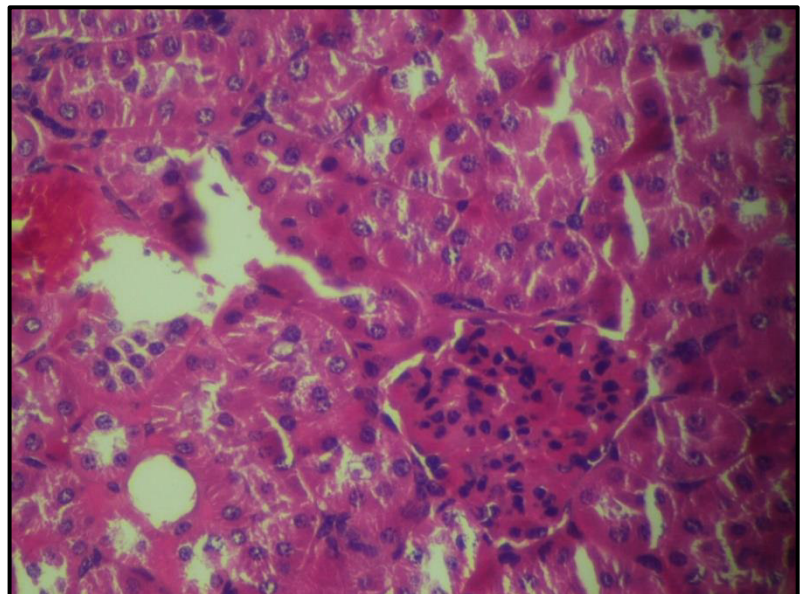
**RIÑON**

**1) A1R**



Congestión renal aguda leve, vénulas, capilares peritubulares en la zona cortical y medular dilatados y cargados de eritrocitos. Integridad de epitelio tubular.

**Foto 25.** Aumento 4X.

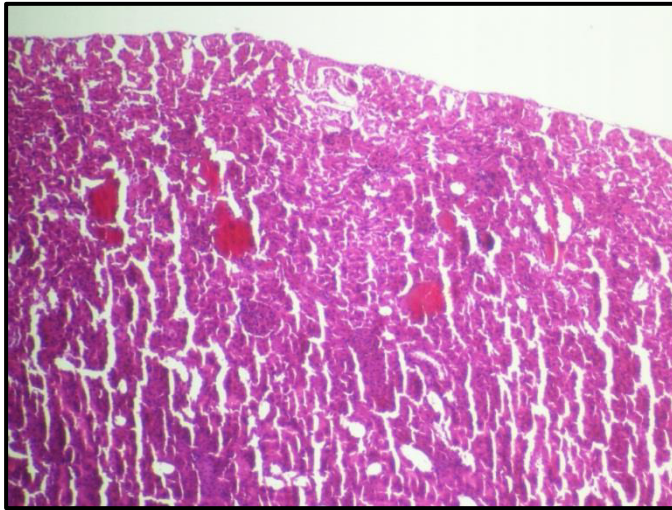


**Foto 26.** Aumento 40X.



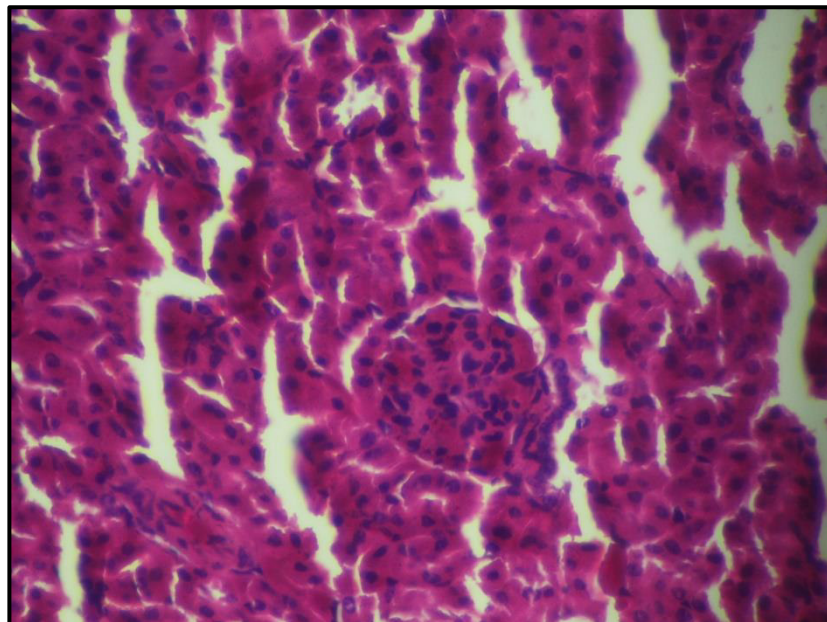
**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

2) R1R



Congestión renal aguda leve, vénulas, capilares glomerulares y peritubulares cargados de eritrocitos. Integridad de epitelio tubular.

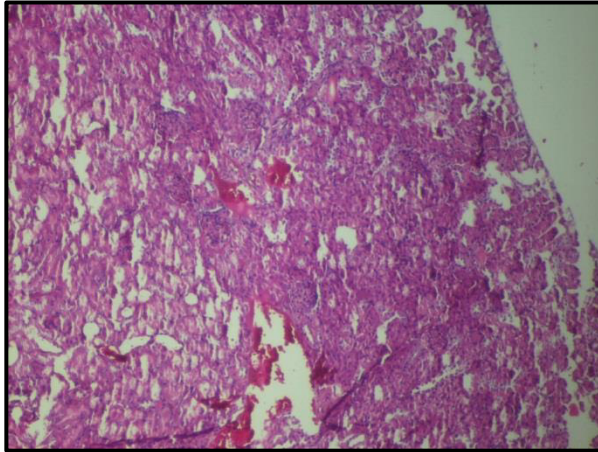
**Foto 27.** Aumento 4X.



**Foto 28.** Aumento 40X

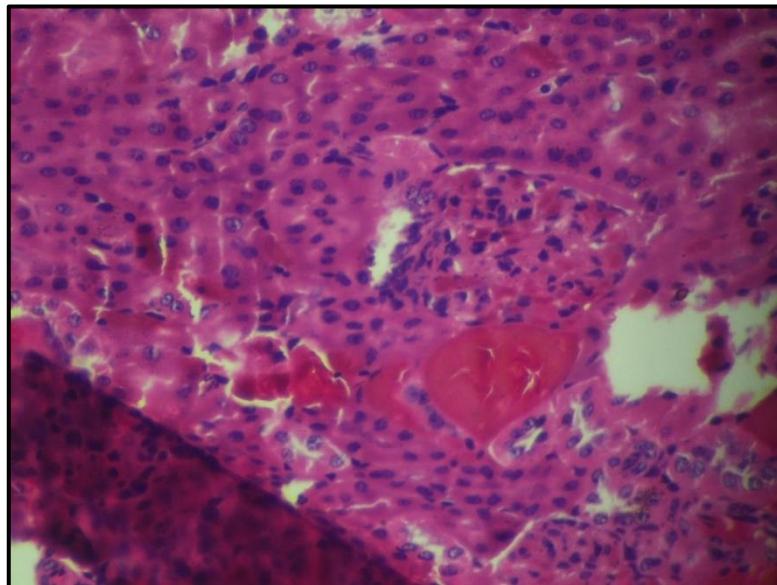
**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

3) R3R



Congestión renal aguda moderada, vénulas, capilares glomerulares y peritubulares cargados de eritrocitos. Integridad de epitelio tubular.

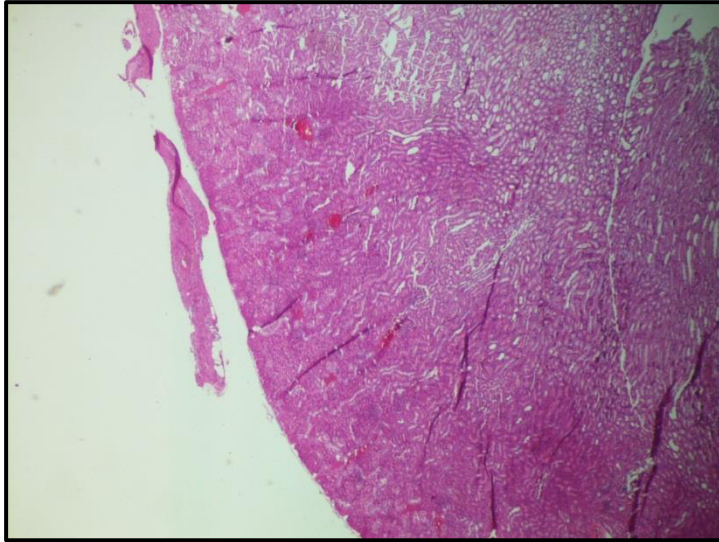
**Foto 29.** Aumento 4X.



**Foto 30.** Aumento 40X

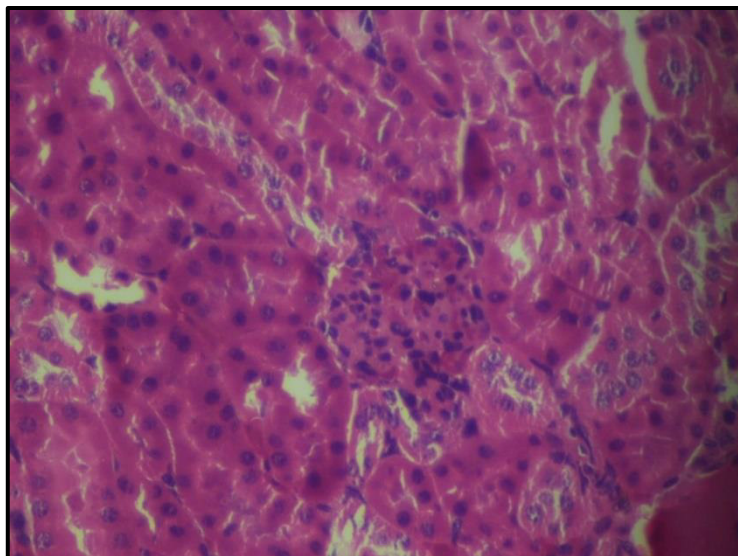
**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

4) R5R



Congestión renal aguda leve, vénulas, capilares glomerulares y peritubulares cargados de eritrocitos. Integridad de epitelio tubular.

**Foto 31.** Aumento 4X.

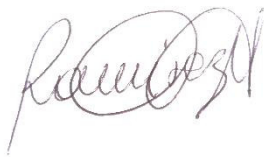


**Foto 32.** Aumento 40X.

**Laboratorio de Histopatología y Parasitología Veterinaria**

**Comentario:**

- Las lesiones observadas son compatibles con el tipo de muerte y la consecuente congestión general por la sobrecarga y trabajo cardiaco durante la agonía.
- La sobrecoloración, los artefactos y el estado congestivo muchas veces pueden ocultar otro tipo de lesiones.
- La lectura ha sido realizada en diferentes aumentos para no descartar nada en la muestra histológica.



**M.V. ROSARIO RAMIREZ MARINA**  
CMVP 3031



**M.V. SARA CAROLINA PIZARRO RIVAS**  
CMVP 5894



## Anexo XII



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



### PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00089-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS : 004400/2017  
SOLICITADO POR : Margarita Camacho Silva  
MUESTRA : EXTRACTO ETANÓLICO DE *Dalea isdori*  
*barneby*  
Nº DE LOTE : ----  
CANTIDAD : 01 Frasco ámbar  
FECHA DE RECEPCIÓN : 29 de Marzo del 2017  
FECHA DE FABRICACION : ----  
FECHA DE VENCIMIENTO : ----

PRUEBA	MÉTODO	RESULTADOS
IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES :		
Muestra 1.1	Cromatografía en capa fina	Rf = 0.30
Muestra 1.2	Cromatografía en capa fina	Rf = 0.29
St. Rutina	Cromatografía en capa fina	Rf = 0.576
St. Quercetina	Cromatografía en capa fina	Rf = 0.897
IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES :		
Muestra 1.1	Cromatografía en capa fina	Rf <sub>1</sub> = 0.562
Muestra 1.1	Cromatografía en capa fina	Rf <sub>2</sub> = 0.8
Muestra 1.2	Cromatografía en capa fina	Rf <sub>1</sub> = 0.559
Muestra 1.2	Cromatografía en capa fina	Rf <sub>2</sub> = 0.85
St. Estricnina	Cromatografía en capa fina	Rf = 0.56
St. Morfina	Cromatografía en capa fina	Rf = 0.24

Rf: Factor de retención.

**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001  
BUREAU VERITAS  
Certification  
N° BR233265







UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA  
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



CONCLUSIONES:

IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES:

Las muestras 1.1 y 1.2 del extracto etanólico de *Dalea isidori barneby* presentaron factores de retención (Rf) de 0.30 Y 0.29 respectivamente, diferentes a los Rf obtenidos del estándar de rutina de 0.576 y el estándar de quercetina de 0.897 en la cromatografía de capa fina.

IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES :

Las muestras 1.1 y 1.2 del extracto etanólico de *Dalea isidori barneby* presentaron unos Rf<sub>1</sub> de 0.562 y 0.559 respectivamente, mientras que el estándar de estricnina presentó un Rf de 0.56 lo cual indica probable presencia de alcaloides indólicos, por otro lado, las muestras 1.1 y 1.2 del extracto etanólico de *Dalea isidori barneby* presentaron también unos Rf<sub>2</sub> de 0.8 y 0.85 respectivamente. El estándar de morfina presentó Rf de 0.24.

Lima, 10 de Abril del 2017

Q.F. Nelson Bautista Cruz  
Director del Centro de Control Analítico



**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ☑ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001  
BUREAU VERITAS  
Certification  
N° BR233265



## Anexo XIII



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



### PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00090-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS : 004400/2017  
SOLICITADO POR : Margarita Camacho Silva  
MUESTRA : EXTRACTO ETANÓLICO DE DALEA ISIDORI  
BARNEBY  
Nº DE LOTE : ----  
CANTIDAD : 01 Frasco ámbar  
FECHA DE RECEPCIÓN : 29 de Marzo del 2017  
FECHA DE FABRICACION : ----  
FECHA DE VENCIMIENTO : ----

PRUEBA	MÉTODO	RESULTADOS
% Alcaloides totales	Volumetría	0.95%

Lima, 10 de Abril del 2017

Q.F. Nelson Bautista Cruz  
Director del Centro de Control Analítico



*"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"*

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú

☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1

E-mail: [cca.farmacia@unmsm.edu.pe](mailto:cca.farmacia@unmsm.edu.pe) <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

BUREAU VERITAS  
Certification

N° BR233265



#### Anexo XIV

Análisis estadístico (ANOVA y test de Tukey) de la variación de volumen en la determinación del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.

Tiempo	Grupo	Media $\Delta$ Vol.	ANOVA	Tukey					
				Control	E. 125 mg/Kg	E.250 mg/Kg	E.500 mg/Kg	AAS 50mg/Kg	Naproxeno 50 mg/Kg
<b>30'</b>	Control	,7450	p =0,000*	-	NS	0.000*	NS	0.000*	0.000*
	E. 125 mg/Kg	,7217		NS	-	0.001*	NS	0.000*	0.000*
	E. 250 mg/Kg	,4183		0.000*	0.001*	-	0.001*	NS	NS
	E. 500 mg/Kg	,7300		NS	NS	0.001*	-	0.000*	0.000*
	AAS 50 mg/Kg	,2317		0.000*	0.000*	NS	0.000*	-	NS
	Naproxeno 50 mg/Kg	,3767		0.000*	0.000*	NS	0.000*	NS	-
<b>60'</b>	Control	,8317	p =0,001*	-	NS	NS	NS	0.005*	0.011*
	E. 125 mg/Kg	,6133		NS	-	NS	NS	NS	NS
	E. 250 mg/Kg	,6083		NS	NS	-	NS	NS	NS
	E. 500 mg/Kg	,8200		NS	NS	NS	-	0.008*	0.016*
	AAS 50 mg/Kg	,5167		0.005*	NS	NS	0.008*	-	NS
	Naproxeno 50 mg/Kg	,5400		0.011*	NS	NS	0.016*	NS	-
<b>120'</b>	Control	1,2050	p =0,648*	-	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 125 mg/Kg	1,1450		NS	-	NS	NS	NS	NS
	E. 250 mg/Kg	1,0750		NS	NS	-	NS	NS	NS
	E. 500 mg/Kg	1,2050		NS	NS	NS	-	NS	NS
	AAS 50 mg/Kg	1,0083		NS	NS	NS	NS	-	NS
	Naproxeno 50 mg/Kg	1,0467		NS	NS	NS	NS	NS	-

E: extracto. NS, No Significativo.



**Continuación.**

Tiempo	Grupo	Media	ANOVA	Tukey					
				Control	E. 125 mg/Kg	E.250 mg/Kg	E.500 mg/Kg	AAS 50mg/Kg	Naproxeno 50 mg/Kg
<b>180'</b>	Control	.9217	p =0,004*	-	NS	NS	NS	NS	0.003*
	E. 125 mg/Kg	.8850		NS	-	NS	NS	NS	0.012*
	E. 250 mg/Kg	.7783		NS	NS	-	NS	NS	NS
	E. 500 mg/Kg	.8683		NS	NS	NS	-	NS	0.022*
	AAS 50 mg/Kg	.8033		NS	NS	NS	NS	-	NS
	Naproxeno 50 mg/Kg	.6350		0.003*	0.012*	NS	0.022*	NS	-
<b>300'</b>	Control	.8517	p =0,678	-	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 125 mg/Kg	.8517		NS	-	NS	NS	NS	NS
	E. 250 mg/Kg	.8483		NS	NS	-	NS	NS	NS
	E. 500 mg/Kg	.8333		NS	NS	NS	-	NS	NS
	AAS 50 mg/Kg	.7667		NS	NS	NS	NS	-	NS
	Naproxeno 50 mg/Kg	.7717		NS	NS	NS	NS	NS	-

E: extracto. NS, No Significativo.

\*P < 0.05 significancia estadística y se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_A$ , p> 0.05 no hay significancia estadística y se acepta la  $H_0$ .

## Anexo XV

Análisis estadístico (ANOVA y test de Tukey) de los datos del tiempo de reacción al dolor (segundos) en la determinación del efecto analgésico del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby.

T	Grupo	N	Media	DS	ANOVA	Tukey					
						Tramadol 20 mg/Kg	Paracetamol 400 mg/Kg	E. 125 mg/Kg	E.250 mg/Kg	E.500 mg/Kg	E.750 mg/Kg
0'	Tramadol 20 mg/Kg	6	4,8550	,33851	0,826	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Paracetamol 400 mg/Kg	6	4,8683	,37360		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 125 mg/Kg	6	5,0250	,18876		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 250 mg/Kg	6	4,9900	,20209		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 500 mg/Kg	6	4,9567	,10386		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 750 mg/Kg	6	4,9350	,18897		NS	NS	NS	NS	NS	NS
30'	Tramadol 20 mg/Kg	6	5,0883	,38763	0,743	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Paracetamol 400 mg/Kg	6	4,9950	,41635		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 125 mg/Kg	6	5,2083	,24003		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 250 mg/Kg	6	5,0817	,18968		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 500 mg/Kg	6	5,0767	,11810		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 750 mg/Kg	6	4,9717	,18137		NS	NS	NS	NS	NS	NS

**Continuación.**

T	Grupo	N	Media	DS	ANOVA	Tukey					
						Tramadol 20 mg/Kg	Paracetamol 400 mg/Kg	E. 125 mg/Kg	E.250 mg/Kg	E.500 mg/Kg	E.750 mg/Kg
60'	Tramadol 20 mg/Kg	6	5,3917	,44897	0,125	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Paracetamol 400 mg/Kg	6	5,1233	,45981		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 125 mg/Kg	6	5,5233	,33500		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 250 mg/Kg	6	5,2667	,25586		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 500 mg/Kg	6	5,1917	,15842		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 750 mg/Kg	6	5,0100	,19637		NS	NS	NS	NS	NS	NS
90'	Tramadol 20 mg/Kg	6	5,9667	,35809	0.000*	NS	0,039*	NS	NS	0,010*	0,000*
	Paracetamol 400 mg/Kg	6	5,3150	,53137		0,039*	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 125 mg/Kg	6	5,8967	,38542		NS	NS	NS	NS	0,024*	0,005*
	E. 250 mg/Kg	6	5,5917	,35667		NS	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 500 mg/Kg	6	5,2017	,20990		0,010*	NS	NS	NS	NS	NS
	E. 750 mg/Kg	6	5,0783	,19580		0,000*	NS	NS	NS	NS	NS

T, tiempo; N, número de animales; ', minutos; DS, desviación estándar; E., extracto. NS, No Significativo.

\*P < 0.05 significancia estadística, p> 0.05 no hay significancia estadística.